



**Université de Montréal**

**Activité physique et récompense : impact de la leptine et de la signalisation  
STAT3 dans les neurones dopaminergiques**

**Par Dominique Matthys**

Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences  
Neurologiques

Mars 2016

© Dominique Matthys, 2016

## **Résumé**

La course d'endurance active le système de récompense (SR) et est reliée aux comportements de recherche alimentaire. L'influence de la leptine sur l'activité physique (AP) volontaire est bien documentée d'un point de vue physiologique, mais très peu en termes d'impact hédonique. La leptine inhibe l'effet récompensant lié à la consommation de nourriture et joue un rôle semblable pour d'autres types de stimuli. La leptine s'arrime à la forme longue du récepteur à la leptine (Leprb) situé sur les neurones à dopamine (DA) et GABA de l'aire tegmentale ventrale (ATV) dans le mésencéphale. *Signal transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) est un facteur de transcription important de la cascade de signalisation de la leptine. La phosphorylation de STAT3 n'est détectée que dans une parcelle des neurones DA positifs pour le Leprb, conférant aux neurones DA STAT3-spécifiques des caractéristiques uniques. Nous avons généré un modèle murin invalidé pour STAT3 sélectivement dans les neurones DA (STAT3<sup>DAT-KO</sup>). La première expérience consistait à évaluer les paramètres métaboliques de base de notre modèle en utilisant les chambres métaboliques *Comprehensive Lab Animal Monitoring System* (CLAMS), incluant l'activité ambulatorie, le ratio d'échanges respiratoires (RER) et la production de chaleur. Les STAT3<sup>DAT-KO</sup> sont hyperactives, démontré par une activité locomotrice augmentée, mais aucune variation entre les deux groupes n'est observée pour le RER et la production de chaleur, en plus d'un gain de poids identique. Une stratégie de récupération ciblant la réinsertion de STAT3 dans les neurones DA du système mésolimbique normalise l'AP

anciennement plus élevée des STAT3<sup>DAT-KO</sup> à celle des contrôles, suivant l'accès libre à une roue d'exercice (RE) pour une durée de 4 semaines, suivant l'accès libre à une roue d'exercice (RE) pour une durée de 4 semaines. L'injection d'un psychostimulant (agoniste du récepteur DA de type 1 (D1R), le Chloro-APB-Hydrobromide (SKF 82958)) reflète une fonction dopaminergique réduite chez les STAT3<sup>DAT-KO</sup>. Un test de recherche compulsive de nourriture révèle une suppression de la prise alimentaire chez les deux groupes expérimentaux. Nous démontrons pour la première fois que la motivation alliée à la course d'endurance, indépendamment de la régulation de la prise alimentaire par la leptine, est dépendant d'une signalisation leptine-STAT3 amoindrie dans les neurones DA du système mésolimbique, révélant STAT3 comme élément clé dans la régulation du tonus dopaminergique et des propriétés récompensantes de l'AP.

**Mots clés :** Leptine, STAT3, dopamine, aire tegmentale ventrale, activité physique, récompense, course.

## **Abstract**

Endurance running is rewarding and related to food seeking behaviors. Influence of leptin on voluntary physical activity is well documented from a physiological point of view, but little is known about its hedonic impact. Leptin inhibits the rewarding aspects of food consumption and plays a similar role for other types of stimuli. Leptin binds to the long form of the leptin receptor, situated on dopamine (DA) and GABA neurons of the ventral tegmental area (VTA) in the midbrain. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) is an important transcription factor of the leptin signalling cascade. Phosphorylation of STAT3 is detected only in a subset of neurons that are positive for the leptin receptor, conferring unique properties to DA STAT3 neurons. We generated a mouse model invalidated for STAT3 selectively in dopamine neurons (STAT3<sup>DAT-KO</sup>). We first assessed basic metabolic parameters of our model using CLAMS metabolic chambers, including ambulatory activity, respiratory exchange ratio (RER) and heat production. STAT3<sup>DAT-KO</sup> are hyperactive as seen by a higher locomotor activity, but there is no inter-group variation of RER and heat production, and the weight gain is the same. A rescue strategy targeting the reinsertion of STAT3 in DA neurons of the mesolimbic system normalizes physical activity of the STAT3<sup>DAT-KO</sup> - which was previously much higher - to that of the control mice, following free access to a running wheel for a period of 4 weeks. The injection of a psychostimulant (agonist of the type1 DA receptor (D1R), Chloro-APB-Hydrobromide (SKF 82958)) reflects a reduced DA signalling STAT3<sup>DAT-KO</sup>. A compulsive food seeking test reveals a suppression of sucrose

intake in both experimental groups. We demonstrate for the first time that the motivation allied to endurance running, independently of food intake regulation by leptin, is dependent upon a diminished leptin-STAT3 signalling in DA neurons of the midbrain, revealing STAT3 as a key player in the regulation of DA tone and the rewarding properties of physical activity.

**Key words** : leptin, Stat3, dopamine, ventral tegmental area, physical activity, reward, running.

## **Table des matières**

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Remerciements.....	xv
Contribution spécifique à l'étude .....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1- L'AP : généralités.....	1
1.2- Évolution de l'AP.....	3
1.2.1- Découverte de la roue d'exercice et impact sur l'étude des différents aspects de l'AP.....	3
1.2.2- Évolution de l'AP chez l'homme .....	4
1.2.3 – AP et régulation de la BÉ .....	5
1.2.4 – L'AP en tant que renforcement positif naturel.....	7
1.3- Régulation centrale de l'APV .....	8
1.3.1- Le circuit de la récompense .....	8
1.3.2 - Le système mésolimbique dopaminergique .....	15
1.3.3 - L'AP et son potentiel addictif .....	18
1.4- La leptine, une hormone d'influence dans le SNC .....	22
1.4.1 – Physiologie de la leptine .....	22
1.4.2 – Impact de la leptine sur le SR.....	26

1.4.3 – Influence de la leptine sur l'AP .....	28
Objectifs .....	30
Chapitre 2 : MÉTHODES .....	31
2.1- Animaux et stratégie de reproduction .....	31
2.2- Mesures calorimétriques indirectes avec le CLAMS .....	32
2.3- Mesure de l'activité locomotrice suite à l'injection d'un agoniste D1R ...	33
2.4- Réinsertion du gène STAT3 dans les neurones DA du système mésolimbique dopaminergique par l'injection stéréotaxique d'un adénovirus associé (AAV) utilisant la stratégie FLEX .....	33
2.4.1 – Détails de la stratégie FLEX .....	33
2.4.2 – Procédures entourant l'injection stéréotaxique de l'AAV .....	34
2.5- Mesure de l'activité physique volontaire .....	35
2.6- Validation de l'infection par l'AAV par immunohistochimie.....	36
2.7- Mesure du comportement de recherche compulsive de nourriture : test de suppression de la prise alimentaire grâce à la présence d'un stimulus aversif .....	38
2.8- Vérification de l'expression de marqueurs des systèmes opioïdes et endocannabinoïdes par <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)....	39
2.9- Statistiques .....	41
Chapitre 3 : Résultats .....	43



3.1- L'invalidation de STAT3 dans les neurones DA influence les paramètres métaboliques de base.....	43
3.2- L'invalidation de STAT3 spécifiquement dans les neurones DA réduit la neurotransmission dopaminergique.....	44
3.3- L'invalidation de STAT3 dans les neurones DA altère le système des opioïdes.....	45
3.4- La recherche compulsive de nourriture ne fait pas partie du phénotype des STAT3 <sup>DAT KO</sup> .....	45
3.5- La recombinaison de STAT3 dans les neurones utilisant la technique FLEX normalise l'APV chez les STAT3 <sup>DAT KO</sup> .....	46
Figure 8 .....	52
Chapitre 4 : Discussion .....	56
4.1- Régulation de l'activité locomotrice par la leptine et influence sur les paramètres métaboliques de base .....	56
4.2- Régulation de la neurotransmission dopaminergique par STAT3 et modulation du système des opioïdes .....	61
4.3- Effets anorectants de la leptine dans les neurones DA et impact sur la recherche compulsive de nourriture .....	67
Chapitre 5 : Conclusions et perspectives.....	69
Références .....	73

ANNEXE I : Article *Leptin suppresses the rewarding of running via STAT3*

<i>signalling in Dopamine neurons</i> .....	95
Adresse Pubmed : .....	95
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26341832">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26341832</a> .....	95
Lien vers la version PDF : .....	95
<a href="http://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131(15)00394-0">http://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131(15)00394-0</a> ...	95

## **Liste des tableaux et figures**

<b>Tableau I</b> : Liste des amorces utilisées dans l'évaluation de l'intégrité du modèle STAT3DAT-KO .....	40
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 1</b> : Diagramme simplifié illustrant les différentes régions principalement impliquées dans la circuiterie hédonique ainsi que leurs projections.....	9
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

<b>Figure 2</b> : Représentation schématique des projections dopaminergiques en partance de l'ATV et de la SN.....	12
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tableau I</b> : Liste des amorces utilisées dans l'évaluation de l'intégrité du modèle STAT3DAT-KO .....	41
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 4</b> : Paramètres métaboliques évalués par les chambres CLAMS. ....	48
--------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 5</b> : Activité ambulatoire suite à l'injection ip de l'agoniste D1R.....	49
--------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 6</b> : Expression relative de l'ARNm des marqueurs des systèmes opioïde et endocannabinoïde. ....	50
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 7</b> : Suppression contexte-dépendante de la prise alimentaire.....	51
--------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 8</b> : Design du vecteur viral et de la stratégie FLEX utilisée pour la réinsertion du gène STAT3 dans les neurones DA. ....	52
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 9</b> : Coupe coronale de l'ATV et validation immunohistochimique de l'infection virale .....	53
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 10</b> : Expression relative de STAT3 normalisée à la cyclophiline suite à sa réinsertion dans le code génétique des neurones DA de l'ATV .....	54
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figure 11</b> : Utilisation volontaire d'une roue d'exercice suivant la chirurgie FLEX .....	55
-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## **Liste des abréviations**

**AMY** : Amygdale

**ANA** : Anorexie basée sur l'activité

**AN** : *Anorexia nervosa*

**AP** : Activité physique

**APV** : Activité physique volontaire

**ARC** : Noyau arqué

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ASIC** : Autostimulation intracérébrale

**ATV** : Aire tegmentale ventrale

**BDNF** : *Brain derived Neurotrophic Factor*

**BÉ** : Balance énergétique

**CCA** : Cortex cingulaire antérieur

**CLAMS** : *Comprehensive Lab Animal Monitoring System*

**COMT** : Catéchol-O-Méthyltransférase

**CPF** : Cortex préfrontal

**D1R/D2R** : récepteurs à la dopamine de type 1 / 2

**DA** : Dopamine

**DAT** : *Dopamine Transporter*

**DÉ** : Dépense énergétique

**DYN** : Dynorphine

**ENK** : Enképhaline

**ERK1/2** : Extracellular-regulated kinases 1/2

**FLEX** : *Flip excision*

**GABA** : *Gamma-amino-butyric acid*

**GLUT** : Glutamate

**HIPP** : Hippocampe

**HL** : Hypothalamus latéral

**HVR** : rongeurs transgéniques avec activité volontaire élevée

**ip** : intra-péritonéal

**JAK** : Janus kinase

**L-DOPA** : 3,4-dihydroxyphénylalanine

**Leprb** : Longue forme du récepteur à la leptine

**LVR** : rongeurs transgéniques avec activité volontaire faible ou normale

**MAO A/B** : Monoamine oxydase A/B

**Nac** : Noyaux accumbens

**NGS** : New goat serum

**NMEs** : Neurones moyens épineux

**NPV** : Noyau Paraventriculaire

**NSC** : Noyau suprachiasmatique

**PBS** : Phosphate Buffet Serum

**PI3K** : phosphatidyl-inositol-3-phosphate

**PPC** : Préférence de place conditionnée

**POMC** : Pro-opiomélanocortine

**RE(s)** : Roue(s) d'exercice

**RER** : Ratio d'échanges respiratoires

**SN** : Substance noire

**SNC** : Système nerveux central

**SR** : Système de récompense

**STAT3** : *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

**TDAH** : Trouble du déficit d'attention avec hyperactivité

**TH** : Tyrosine hydroxylase

**β-END** : β-endorphine

## **Remerciements**

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche Dre Stéphanie Fulton pour avoir cru en mes capacités, et pour m'avoir fait autant confiance. J'ai particulièrement apprécié la proximité qu'elle avait avec ses étudiants. Merci à ma superviseure de départ Dre Stéphanie Tobin, qui m'a initiée aux différentes techniques utilisées dans le laboratoire. Je remercie également Dr Thierry Alquier pour son écoute et ses bons conseils, de même que les membres de mon comité de parrainage, Dr Didier Jutras-Aswad et Dre Christine Vande Velde pour leur écoute et recommandations. Merci à mes collègues, soit Cécile Hryhorczuk, Alexandre Fisette, Stephanie Auguste et Léa Décarie-Spain pour leur aide précieuse à travers mes projets. Merci énormément à Dr Numa Dancause et Dr Stephan Quessy, qui m'ont donné la chance de vivre une première expérience en recherche.

Finalement, je remercie du fond du cœur ma famille et mes amis, pour leur support et appui continus. Je vous aime!

Dominique



## **Contribution spécifique à l'étude**

En tant qu'étudiante à la maîtrise dans le laboratoire de Stéphanie Fulton, mon rôle fut de répondre aux demandes des réviseurs d'un article soumis à l'été 2014 au journal *Cell Metabolism* et intitulé '*Leptin suppresses the rewarding effects of running via STAT3 signalling in dopamine neurons*'. Cet article est le projet de thèse de ma collègue Dre Maria Fernanda A. Fernandes. Les résultats exposés dans ce mémoire représentent l'intégralité des expériences que j'ai menées en vue de la re-soumission de l'article, qui a par ailleurs été publié dans l'édition d'octobre 2015 de *Cell Metabolism* et pour lequel je suis deuxième auteure. L'article en question se trouve en annexe de ce mémoire, et j'y ferai régulièrement référence, afin de favoriser la compréhension du lecteur.

# **Chapitre 1 : Introduction**

## **1.1- L'AP : généralités**

L'exercice procure des effets bénéfiques d'un point de vue physiologique, mais également psychologique en activant le SR dans le cerveau. La recherche sur l'impact psychologique de l'exercice, qui s'est entamée il y a plus de cent ans, est en pleine effervescence, tant sur le plan fondamental que clinique. La sédentarisation sociétale des pays développés en est le principal contribuable. En effet, pas moins de 30% de la population mondiale est physiquement inactive [1]. L'Organisation Mondiale de la Santé définit l'AP comme étant «tout mouvement corporel produit par les muscles qui requiert une dépense d'énergie.»[2]. Une définition bien simple, mais dont les bénéfices engendrés sont tout sauf négligeables. Les bienfaits de l'AP sont vantés depuis l'Inde antique (1500-600 av. J-C) [3], et sa prescription débuta au 20<sup>e</sup> siècle avec le cardiologue Paul Dudley White, suite à une attaque cardiaque du président des États-Unis Dwight Eisenhower [4]. La prescription progressive de l'AP comme traitement thérapeutique faisant suite à cette première intervention médicale, fit passer le temps de repos au lit de 6 mois à maintenant 2 semaines pour les gens ayant subi d'une crise cardiaque [4].

L'AP aérobique en particulier, comme la course, la nage et le cyclisme, sert de thérapie préventive et/ou secondaire destinée à plus de 35 maladies chroniques [5] incluant les problèmes de dépendance [6], le syndrome métabolique, les problèmes cognitifs [7, 8] et les troubles de l'humeur [5], et est mesurable via l'amélioration du

VO<sub>2</sub> max, défini comme la consommation maximale d'oxygène [9-13]. Bien que l'AP aérobie consiste en un stress physique, ses effets ne sont nullement délétères, comparativement à un stress psychologique [14]. Le stress physique régule la balance énergétique (BÉ) [14]. Il provoque une élévation du taux plasmatique de cortisol, qui est aussitôt inactivé en cortisone [15]. Cette inhibition induite par l'AP sert de protection contre les conséquences à long terme néfastes du cortisol [15], comme l'hypertension [16] et le désordre dépressif majeur [17]. Le stress psychologique réduit le mécanisme d'inactivation du cortisol et est donc un promoteur de ces pathologies [18, 19].

Dans la littérature, l'un des principaux méfaits relié à l'AP ayant été relevé est le syndrome du surentraînement [20]. Le surentraînement entraîne des conséquences physiologiques et psychologiques négatives découlant d'un mauvais dosage de la fréquence et de l'intensité de l'exercice physique pratiqué [20]. D'après *European College of Sport Science*, les symptômes du surentraînement vont totalement à l'opposé des bienfaits d'un dosage normal de l'AP [21]. Les conséquences du surentraînement dans le SNC peuvent être la résultante d'une dépendance à l'AP, tout comme les effets centraux associés à une dépendance aux drogues psychotropes [6]. L'AP de très haute intensité a également été rapportée, à certains égards, comme étant nuisible d'un point de vue biochimique [22-24]. Néanmoins, incorporer l'AP de façon raisonnable mais régulière à son mode de vie est tributaire d'une amélioration de la balance énergétique et du bien-être psychologique. Le système nerveux central (SNC) est la pierre angulaire ainsi que le

centre d'intégration et d'interprétation des signaux internes et externes à l'organisme et est directement influencé par l'AP.

Les sections qui suivent dressent donc un bilan exhaustif mais concis des paramètres qui entourent la régulation de l'AP d'un point de vue neurophysiologique, neuropsychologique et neuroendocrinologique.

## **1.2- Évolution de l'AP**

### ***1.2.1- Découverte de la roue d'exercice et impact sur l'étude des différents aspects de l'AP***

En recherche fondamentale, la RE est sans contredit un outil expérimental de choix afin d'étudier l'AP sous différents aspects. Stewart fut le premier à utiliser cet appareil en 1898, afin de mesurer l'effet de la diète, l'alcool et la pression barométrique sur l'activité de souris [25]. Il est dit que, indépendamment de l'activité locomotrice, l'action de courir chez les rongeurs varie selon le cycle et l'intensité de la lumière [26]. Cette observation est intéressante, puisqu'elle évalue un comportement locomoteur distinct. Elle crédibilise l'utilisation des REs dans la détermination des éléments déclencheurs de l'AP volontaire (APV), comparativement à d'autres techniques évaluant l'activité de façon plus générale [27]. *A priori* et suite à l'observation de modèles animaux tels que le campagnol roux et le lemming scandinave, l'utilisation de REs fut associée au fait de s'échapper/se sauver ou de couvrir une certaine distance [28]. Plus précisément, il apparaîtrait que courir une longue distance est valable seulement si, indépendamment de ladite distance, le

but/gain est percevable [27]. Pour ce qui est de l'accessibilité du gain, les études se confrontent [27-29]. Certaines stipulent que l'utilisation de REs se réfère au parcours d'une distance calculée, donc que le but est atteignable [28]. D'autres études vont à l'opposé du propos précédent, affirmant que l'initiation à l'utilisation de la RE est tributaire du parcours de longues distances, car le but n'est pas atteignable et/ou non-percevable, donc exploratoire et associé à la recherche de ressources [27, 29]. Bien que le principe de migration exploratoire ait été officiellement énoncé et décrit par Baker en 1978 [29], les premières études faisant usage des REs ont observé que les rongeurs exploitaient ces roues lorsque confrontés à un environnement nouveau, et que leur utilisation diminuait suite à une habituation à cet environnement [29, 30]. Le sentiment de faim et de soif corrèle également avec une augmentation de l'utilisation de la RE [31, 32], et celle-ci varie en fonction de plusieurs facteurs, dont le sexe, l'âge, la lignée, le contenu calorifique et nutritionnel de la nourriture consommée et le poids [33-35]. De façon intéressante, il a été démontré que l'usage de REs chez un groupe de rats était délaissé si l'emploi de cette dernière ne menait pas à un gain alimentaire et si, en plus, 40% de leurs poids corporels était requis pour faire tourner la roue [36].

### ***1.2.2- Évolution de l'AP chez l'homme***

D'un point de vue évolutif, les hominidés, ou de façon plus large les bipèdes ont toujours été, en comparaison aux quadrupèdes, des coureurs d'endurance d'exception [37]. Ils possèdent les caractéristiques physiologiques – principalement la présence de glandes sudoripares - nécessaires à une dépense énergétique (DÉ) d'envergure, mais contrôlée, incluant une meilleure dissipation de la chaleur interne

et une meilleure thermorégulation [37]. Alors que certaines études anthropologiques stipulent que la capacité d'endurance de l'homme est principalement reliée à une évolution des fonctions locomotrices à proprement dit [37, 38], Carrier soutient que, dans une période où les ressources alimentaires étaient distales et la compétition entre charognards, féroce, le but premier du développement d'une telle capacité aurait été celui d'assouvir la faim, donc de survivre [39]. L'AP est influencée par l'état métabolique de l'individu [40]. Ainsi, le sentiment de faim pouvait amener l'homme primitif à consacrer plus de deux jours à la poursuite de sa proie [41]. Un parallèle peut être fait avec les études chez les rongeurs, chez qui la motivation à courir sur une RE serait associée à la recherche de nourriture et au sentiment d'éveil associé à la faim, dans un contexte où l'accès à la nourriture est restreint et ce, sans regard sur la provenance du modèle animal (laboratoire ou milieu sauvage) [42, 43]. Les mammifères accordent donc une valeur importante envers le coût énergétique relatif au contentement d'un besoin instinctif.

### ***1.2.3 – AP et régulation de la BÉ***

Chez les animaux comme chez les hominidés, il semble y avoir une régulation de cette balance énergétique. Certaines études datant de plusieurs années soutiennent que l'absence de ressources alimentaires se traduit par une augmentation de l'activité exploratoire en réponse à une élévation de l'activité hypothalamique [44, 45]. Cependant, il est à noter que la régulation de la BÉ est variable d'un point de vue fondamental, moyennant une hétérogénéité causale vers l'utilisation de la RE en réponse à la présence ou l'absence de nourriture, et en réponse au fait d'anticiper ou de consommer la nourriture comme tel. L'emploi de la

RE en soi n'est qu'une parcelle des paramètres régulateurs de la BÉ et n'y est certainement pas restreinte. Chez l'humain, les études se concentrent sur la DÉ tirée de l'AP ainsi que sur le comportement alimentaire et le sentiment d'appétit qui en découlent. La relation entre la consommation d'énergie et sa dépense est complexe et des plus variables, étant affectée par le poids, la composition de la masse corporelle, le statut d'activité, l'âge et le genre de l'individu [46-48]. Il a cependant été démontré à plusieurs reprises que le sentiment de faim corrèle, à court terme, de façon inversement proportionnelle à l'intensité de l'exercice physique pratiqué [49-52] alors qu'à long terme, la littérature est parsemée de contradictions [47, 48, 53]. Néanmoins, il est généralement accepté que la consommation énergétique augmente avec l'intensité de l'exercice sans pour autant atteindre une BÉ positive [54]. Malgré un nombre important de révélations sur le lien entre l'AP et l'appétit, il n'en demeure pas moins ardu, dans un contexte clinique, de parler de recherche de nourriture à proprement dit. Il est davantage discuté des bienfaits de l'AP sur la santé populationnelle et de ses effets sur l'appétit *a posteriori* [55], à l'exception de contextes pathologiques associés à l'hyperphagie, comme le syndrome de Prader Willi [56] et la boulimie nerveuse (*bulimia nervosa*) [57].

À la lumière de ce qui a été proposé jusqu'à maintenant, il est possible d'affirmer que l'AP était et est toujours, d'abord et avant tout, un moyen de survie. Une spéculation intéressante ressort de ce propos, soit que la course d'endurance se baserait avant tout sur la motivation associée à un renforcement positif – dans le cas présent un gain alimentaire *a priori* non-percevable ou inatteignable - et que cette base motivationnelle corrélait positivement à une activation du SR.

#### **1.2.4 – L'AP en tant que renforcement positif naturel**

Chez les modèles animaux, les propriétés de renforcement de l'AP varient selon l'espèce et la lignée, encore une fois. Le potentiel de renforcement de la RE a été évoqué par Bolles en 1975 [58], et plusieurs études ont validé la RE en tant qu'élément d'enrichissement environnemental en elle-même et pas nécessairement relié à un comportement exploratoire associée à la survie ou à la régulation homéostatique [59]. Pour preuve, il a été démontré que, malgré une suppression de la vision [60-62], de l'odorat [63, 64] ou de l'ouïe [65] chez le rat, l'utilisation de la RE ne s'en retrouvait pas réduite [59]. En d'autres termes, la RE possède des propriétés de renforcement associées aux effets physiologiques et psychologiques de l'APV en eux-mêmes. Plusieurs équipes ont également amené, de manières différentes, des preuves supplémentaires à cette hypothèse de renforcement positif [66-69].

D'un point de vue clinique, il est également possible de discuter de l'aspect motivationnel de l'AP pour son effet bénéfique quant à l'amélioration des troubles de l'humeur tels que la dépression, et améliore l'humeur en général. Alors que nombres d'études se penchent davantage sur des recensements de l'appréciation du sport auprès de la population ou encore sur les moyens encourus vers la promotion de l'AP dans la société, une autre partie de la recherche s'attarde sur la motivation de certains individus (les athlètes, par exemple) à être actifs physiquement. Ces études relèvent un facteur de maintien et d'initiation à l'AP communs, soit la présence d'une autodétermination de par la volonté de combler un besoin [70, 71]. Ce besoin se définit surtout par la quête d'un bien-être psychophysique [70, 71].



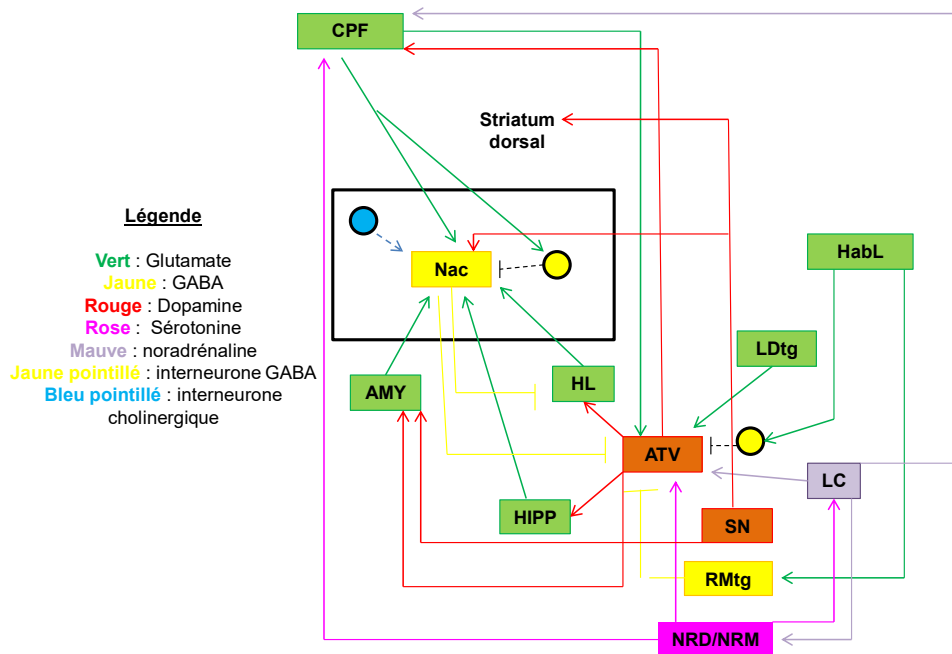
### **1.3- Régulation centrale de l'APV**

L'AP est bénéfique pour l'individu, il n'y a aucun doute. Cependant, ce bénéfice est la résultante de contextes sociaux et physiologiques complètement différents. Historiquement, être actif physiquement était, au même titre que n'importe quelle autre activité propre à la santé, une habitude de vie innée ou transmise dès le plus jeune âge [72]. Elle était conservée de l'enfance à la sénescence et ce, à des fins de survie [72]. Au fil du temps, ce comportement s'est dissipé, passant premièrement d'une enfance naturellement active vers une vie adolescente et adulte inactives (perte d'une habitude) à, aujourd'hui, une inertie désolante (absence totale du comportement) [72]. La motivation à être actif physiquement relève d'une communication entre les régions corticales et sous-corticales. Le SR, en particulier, est un acteur principal de la régulation centrale de l'APV et inclut un amalgame de régions influençant l'aspect motivationnel et émotif de différents stimuli, autant hédoniques qu'avर्सifs [72-75]. Ce dernier est activé en premier lieu chez les individus sédentaires, puisque la capacité à anticiper l'obtention à long terme d'une récompense est réduite, garante de fonctions cognitives affaiblies [76]. L'inverse est observé chez les individus actifs physiquement [72, 77], où le SR s'inscrit plutôt dans un délai d'activation, sous-tendant une inhibition améliorée de l'agir impulsif ainsi qu'une meilleure capacité d'anticipation vis-à-vis l'atteinte – moyennant une dépense d'énergie notable - d'une récompense plus éloignée dans le temps [78-81].

#### **1.3.1- Le circuit de la récompense**

La poursuite d'un but est directement liée à l'activation du circuit de la récompense [82], et son organisation se base sur les expériences positives ou

negatives passées ainsi que sur l'anticipation ou l'analyse situationnelle d'un plaisir potentiel futur [83]. Ce circuit inclut plusieurs régions cérébrales (**Figure 1**) dont le rôle respectif varie dépendamment de la nature de la récompense, et la manière dont cette récompense est obtenue, anticipée ou consommée [75, 84].



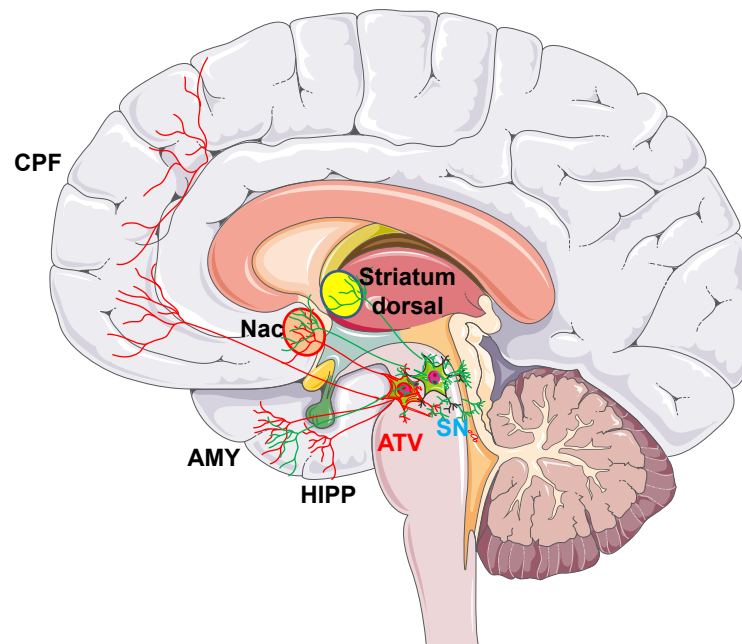
**Figure 1 :** Diagramme simplifié illustrant les différentes régions principalement impliquées dans la circuiterie hédonique ainsi que leurs **projections**. Le CPF envoie des efférences glutamatergiques vers les NMEs du Nac ainsi que ses interneurons GABA. Les NMEs du Nac ciblent le HL et l'ATV avec ses projections GABA. L'AMY, l'HIPP et le HL envoient des projections glutamatergiques excitatrices vers le Nac également, mais ces régions sont ciblées par des afférences

dopaminergiques en provenance de l'ATV et de la SN, qui envoient également des efférences dopaminergiques vers le Nac et le CPF. La SN innerve également le striatum dorsal. L'HabL possède des neurones glutamatergiques affectant les interneurones GABA de l'ATV et le RMTg. La libération de glutamate du LDTg affecte la neurotransmission dopaminergique de l'ATV. Le RMTg affecte cette même région, mais grâce à ses projections GABA. Le LC possède quant à lui des neurones libérant de la noradrénaline, ciblant le CPF, l'ATV et le NRD/NRM. Finalement, le NRD/NRM possède des neurones libérant la sérotonine et projette vers le CPF, l'ATV et le LC. RMTg, tegmentum rostro-médian, LDTg, tegmentum latéro-dorsal, NRD et NRM, noyau raphé dorsal et médian, HabL, Habenula latérale. Construction inspirée de [85] et [86].

À première vue, le concept du plaisir est tout à fait subjectif [83]. Ce sentiment est cependant mesurable d'un point de vue neurobiologique et comportemental, sans regard sur l'intensité du plaisir ressenti ou du type de plaisir expérimenté [83]. Il peut être mesuré grâce, entre autre, au conditionnement classique ou associatif de Pavlov [87, 88], au conditionnement opérant ou instrumental de Skinner [89], et même par l'observation, selon Berridge, des expressions orofaciales [83]. L'autostimulation intracérébrale (ASIC) est également une technique expérimentale de choix dans l'évaluation de la sensibilité du SR [90]. Cette approche [90, 91], additionnée d'essais pharmacologiques ciblés ont permis de permettre d'affirmer que l'hédonisme en soi est exprimé à travers un réseau neuronal complexe [83, 92-94] (**Figure 1**). L'évaluation d'une récompense, la discrimination entre différents types de stimuli ainsi que l'exécution d'un comportement dirigé vers un but impliquent les neurones situés

d'avantage dans le cortex [83]. Les neurones répondant à la délivrance et à l'anticipation d'une récompense impliquent les mêmes régions corticales (cortex cingulaire antérieur, dorsolatéral et insulaire), mais également le striatum ventral (noyau accumbens (Nac)), le striatum dorsal (pallidum ventral, caudé et putamen), la substance noire (SN)), l'hippocampe (HIP) et l'amygdale (AMY) [75, 82, 83, 85], pour ne nommer que celles-ci. Le Nac est impliqué dans les propriétés de renforcement des stimuli à proprement dit, alors que le striatum dorsal a plutôt un rôle spécifique dans la phase initiatrice de la prise de décision, suite au contact ou à l'anticipation d'un certain stimulus. Il intègre les informations sensorimotrices, émotionnelles et cognitives [95]. Le striatum dorsal est aussi un acteur crucial dans le processus d'habituation découlant d'un apprentissage donné [96]. L'amygdale, quant à elle, est responsable de la réactivité et de l'apprentissage émotionnel face aux stimuli, qu'ils soient hédoniques ou aversifs [97]. L'HIP –de façon très succincte – est impliqué dans l'adaptation neuronale à long terme, suivant une exposition prolongée aux propriétés de renforcement des stimuli, en fonction de la durée et de la fréquence associées à leur exposition [98]. Bien que le circuit de la récompense soit complexe, l'aspect motivationnel associé à la poursuite d'une récompense est associé à une activation des neurones de l'ATV, projetant des efférences dopaminergiques vers le Nac [85]. L'ATV projette également des efférences dopaminergiques vers le cortex préfrontal (CPF) (fonctions exécutive, prise de décision), l'HIP (mémoire) et l'AMY (émotions, mémoire émotionnelle), modulant alors différents aspects du circuit de la récompense et formant le circuit mésocorticolimbique [85]. La SN contient des neurones à DA qui envoient des projections au striatum. Il a également été démontré

que la partie médiane envoie ces mêmes projections vers le Nac et alors que sa région dorso-latérale innerve l'AMY, exerçant un contrôle important sur le mouvement, la recherche de récompense et l'aspect émotionnel relié à divers stimuli [85, 99] (**Figure 2**).



**Figure 2 : Représentation schématique des projections dopaminergiques en partance de l'ATV et de la SN.** L'ATV projette des efférences dopaminergiques vers plusieurs régions dont le Nac, l'HIPP, l'AMY et le CPF afin de moduler différents aspects de la motivation. La SN projette des efférences dopaminergiques vers le striatum dorsal, l'AMY et le Nac. Le cerveau et les neurones ont été extraits de la banque d'images Servier Medical Art [100].

Le Nac est formé à 95% de neurones moyens épineux (NMEs) GABAergiques [101], qui expriment soit des récepteurs dopaminergiques de type 1

(D1R) ou 2 (D2R), et contiennent des opioïdes endogènes tels que la dynorphine (DYN) et l'enképhaline (ENK), respectivement. Les NMEs contenant les D1R forment la voie directe ou striatonigrale, désinhibant l'activité locomotrice [102]. Les NMEs contenant les D2R forment la voie indirecte ou striatopallidale, tributaire d'une activité locomotrice réduite [102]. L'interaction entre ces deux circuits, formant une partie importante des ganglions de la base, est garante d'une coordination adéquate de la motricité volontaire [102]. Dans le même contexte, le Nac, une région du cerveau «émotif» par comparaison au cerveau «cognitif» (pour plus de détails, consulter l'excellente revue de Mogensen et al., 1980 [103]) reçoit des afférences excitatrice provenant du système limbique, et fait partie de la phase dite «initiatrice», dans la hiérarchie de la réponse locomotrice volontaire [103]. Le Nac sert également de lien transitoire entre cette phase d'initiation et d'interprétation des signaux neuronaux, où ses projections GABAergiques vers les ganglions de la base activent soit la voie directe, soit la voie indirecte [103]. Dans un autre ordre d'idées, le Nac est une structure clé dû à son rôle dans l'effet de renforcement de plusieurs stimuli, envoyant mais recevant également la plupart des signaux provenant des structures corticales et sous-corticales participant à la modulation des différents aspects de la récompense [85]. Le Nac est par ailleurs activé par des substances propres à l'abus telles que les drogues d'abus [104], la nourriture palatable [90, 105], le sexe [106] et l'AP [40, 107]. Le Nac reçoit des afférences glutamatergiques en provenance de l'HIPP, du CPF ainsi que de l'AMY, mais envoie des projections GABAergiques inhibitrices à l'hypothalamus latéral (HL) et à l'ATV [108]. Les régions mentionnées communiquent également entre elles grâce au glutamate (GLUT). De plus, l'ATV et le Nac

contiennent des interneurons – GABA dans le cas de l'ATV, puis GABA et cholinergiques, entre autre, pour le Nac – qui contrôlent la relâche de DA des neurones DA de l'ATV, et de GABA des NMEs [85]. Toutes ces régions seraient également modulées par des afférences sérotoninergiques en provenance du noyau raphé dorsal et médian ainsi que noradrénergiques du locus coeruleus, siège de l'éveil [85]. L'HL exerce également une influence glutamatergique sur les neurones DA de l'ATV, provoque un renforcement opérant par l'induction d'une ASIC et reçoit des afférences GABAergiques inhibitrices du Nac [85]. L'activité opioïdérique est également un élément important du SR, tel que confirmé par Bozarth et Wise [109-111]. Par exemple, être en contact avec des renforçateurs naturels tels que l'AP et la nourriture ainsi que certaines drogues d'abus active d'une part le système de récompense et peut inclure l'intervention des opioïdes. La morphine, entre autre, est un opiacé mimant l'effet de certains opioïdes endogènes [112]. L'ATV en particulier est sensible aux effets de la morphine en ce sens que l'injection directe de morphine dans l'ATV augmente la fréquence d'ASIC chez le rat [113]. Les opioïdes endogènes influencent de façon importante le seuil d'intensité ainsi que la fréquence de l'ASIC [113]. L'ENK et la  $\beta$ -endorphine (ou morphine endogène) ( $\beta$ -END) sont particulièrement reconnus pour leur propriétés analgésiques et se retrouvent d'abord sous forme de précurseurs, soit la pro-enképhaline et la pro-opiomélanocortine (POMC). L'auto-administration de l'ENK et de la  $\beta$ -END a été observée, et les animaux démontrent des symptômes de sevrage lorsqu'injectés à la naloxone [114-117]. La DYN (précurseur : pro-dynorphine) est aussi un opioïde endogène dont l'activité ne se limite pas à ses effets analgésiques [118, 119]. Trois types de

récepteurs opioïdes sont impliqués, soit le kappa (DYN) (KOR), le delta (ENK) (ENK), et le mu ( $\beta$ -endorphine) (MOR). Les opioïdes sont abondamment distribués dans le SNC et se retrouvent sous plusieurs isoformes différentes [112, 113], en plus de moduler la neurotransmission dopaminergique [120-123] (voir l'excellente et exhaustive revue suivante [112] pour plus de détails). Malgré tout, la DA, et plus particulièrement la communication dopaminergique corticomésolimbique semble jouer un rôle essentiel dans l'aspect renforçateur associé à la poursuite d'une récompense et dans les processus motivationnels comme tel [124]. L'interaction entre l'ATV et le Nac, plus particulièrement, forme le cœur du système mésolimbique dopaminergique, est relié à la reconnaissance environnementale des stimuli récompensants, ainsi qu'à leur consommation [84].

### **1.3.2 - Le système mésolimbique dopaminergique**

L'importance du système mésolimbique dopaminergique dans les fonctions associées à la récompense est bien documentée [99, 125]. Ce système répond à des renforçateurs naturels et synthétiques [90, 126], par exemple, l'AP et certaines drogues d'abus [126]. La DA est un neurotransmetteur modulateur faisant partie de la famille des catécholamines, qui incluent l'adrénaline et la noradrénaline. La tyrosine circulante s'incorpore dans les neurones à DA pour former le L-DOPA, grâce à l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) et consiste en l'étape limitante de la formation de la DA. Le DOPA décarboxylase transforme finalement le L-DOPA en DA. Après avoir exercé son action, la DA est soit dégradée par la monoamine oxydase A/B (MAOA/B), produisant du L-DOPAC, ou le catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) produisant le 3-Méthoxytyramine. Le produit final du métabolisme de la DA



est l'acide homovanillique- qui peut être produit par l'une ou l'autre des voies métaboliques -, mais la DA peut également être recaptée dans la cellule présynaptique par le transporteur membranaire de la DA (DAT) [127]. Les récepteurs à la DA sont des récepteurs couplés aux protéines G [128]. La famille des D1R, qui inclus les récepteurs D1 et D5, sont couplés à une protéine g stimulante et sont donc fonctionnellement excitateurs alors que la famille des D2R, qui comprend les récepteurs D2 à D4 ont des fonctions inhibitrices, puisque couplés à une protéine g inhibitrice [128]. L'acquisition de connaissances approfondies sur la fonction et le comportement de ce neurotransmetteur s'est développée principalement grâce à l'étude de la dégénérescence nigrale des neurones à DA dans la maladie de Parkinson, ainsi qu'en observant les conséquences comportementales découlant d'une modulation, par des essais pharmacologiques, de la neurotransmission dopaminergique [129]. Pour ce qui est de l'impact de la DA sur la sensibilité du SR à proprement dit, des expériences d'ASIC sur le faisceau médian prosencéphalique – contenant les fibres nerveuses du circuit de la récompense et traversant entre autre l'ATV et l'HL - sont davantage relevées dans la littérature [90, 91].

La DA peut être libérée de façon tonique et phasique [130, 131]. Le phénomène de libération phasique est influencé par les courants synaptiques glutamatergiques activant les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA), et exercent davantage leur action sur les D1R postsynaptiques [131-134]. La libération phasique de DA dans le Nac est cruciale car elle influence directement le processus d'apprentissage relié à la sensibilité aux propriétés hédoniques des stimuli ainsi qu'au

niveau d'effort moteur/locomoteur à fournir afin d'atteindre ces récompense [135-137].

Les études sur les drogues d'abus et la consommation de nourriture palatable ont allègrement démontré l'influence cruciale de la DA sur la dépendance. En effet, la libération de DA dans le Nac est promue directement ou indirectement par plusieurs drogues d'abus [138] et sa stimulation engendre un renforcement de leur consommation [138]. Le phénomène de renforcement est également observé avec la nourriture palatable [138, 139] et requiert la présence du D1R et du D2R [140, 141]. Il est par le fait même intéressant de constater l'influence importante du circuit mésolimbique dopaminergique sur l'aspect hédonique de l'AP.

### **Influence du système mésolimbique dopaminergique sur l'AP**

Le système mésolimbique dopaminergique est activé par l'exercice physique, au même titre que les drogues d'abus [142]. Il a été démontré que lorsqu'un groupe de souris est exposé à une tâche préférentielle, soit l'accès à une RE et des boulettes de saccharose, ces dernières passaient une durée de temps plus élevée envers l'utilisation de la RE [143]. Cet effet fut renversé par l'injection d'halopéridol – un antagoniste des D2R - et ciblé dans le cœur du Nac, conférant un rôle crucial de la transmission dopaminergique dans les comportements d'activité volontaire [143]. Un environnement enrichi, en général, est associé à une augmentation des taux de TH dans les neurones du mésencéphale [144]. À cet effet, une étude effectuée chez des rats reproduits sélectivement pour développer une volonté élevée (HVR) ou faible (LVR) à courir a observé une réduction significative du nombre de NMEs matures dans le Nac de même que les éléments du transcriptome dopaminergique des LVRs

[145]. Ce nombre augmentait cependant grâce à la potentialisation synaptique qu'entraînait leur exposition à une RE [145]. La même équipe a également soulevé l'importance des D1R dans l'effet récompensant associé à la course en utilisant la même manipulation génétique [146], et il a été rapporté que le taux de DA est augmenté dans le Nac de rats reproduits pour courir de longues distances[147]. Greenwood et al. ont quant à eux démontré qu'une PPC était induite chez des rats ayant accès ad libitum à une RE six semaines durant [148]. Une augmentation du cFOS – un marqueur de l'activité cellulaire - dans le Nac fut observée et, comme avec les drogues d'abus, une élévation des taux de TH et de DOR dans la coquille du Nac en comparaison aux rats sédentaires [148]. Greenwood a observé les mêmes résultats chez deux groupes de rats ayant respectivement l'accès libre ou forcé à une RE, en plus de mesurer une élévation de cFOS dans les neurones de la voie directe (DYN +) du striatum dorsal et du Nac [149]. Le système mésolimbique dopaminergique est donc un joueur important dans les comportements reliés à l'APV [145].

### ***1.3.3 - L'AP et son potentiel addictif***

Les individus qui arrêtent d'être régulièrement actifs physiquement développent certains symptômes de sevrage identiques à ceux observés chez les personnes consommant de la drogue ou de la malbouffe sur une base régulière, soit de l'anxiété et une dysphorie sévère, et cette observation est la même chez les rongeurs [6, 150-153]. Brené et al. ont dressé un portrait intéressant de la RE en tant qu'activité naturelle affectant les fonctions cérébrales au même titre que les drogues d'abus [6]. Il est donc possible de développer une dépendance à l'AP [6, 151]. Le

développement d'une tolérance grâce à une exposition prolongée à une RE peut amener les rongeurs à utiliser cet enrichissement environnemental de façon compulsive [6, 154, 155] ou encore provoquer une tolérance croisée avec d'autres drogues telles que la morphine et la cocaïne [156, 157]. Cette même tendance – l'ignorance de ses limites - peut être observée chez les coureurs d'endurance et dans le syndrome plus général du surentraînement[158].

L'AP stimule les mêmes régions cérébrales que les drogues d'abus et agissent de façon très similaires d'un point de vue neuromoléculaire [6, 159]. À cet effet, Morris, Na et Johnson ont donné libre accès à une RE à des rats pour une période de 2 à 5 semaines, avant de procéder à des séances d'ASIC dans l'HL. Ils ont découvert que le seuil requis pour démarrer l'auto stimulation était réduit significativement chez le groupe expérimental, validant les propriétés hédoniques de l'AP[160]. Le retrait subséquent de l'accès à la RE était associé à une augmentation graduelle du seuil de récompense sur une période de deux semaines, après quoi le seuil revenait au même qu'en conditions basales, précédant l'accès initial à la RE [160]. Les propriétés de renforcement de la course ont cependant été démontrées beaucoup plus tôt par Collier et Hirsch, dans un contexte où le rat contrôle lui-même la durée et vitesse de la RE, dans une tâche de conditionnement opérant avec ratio fixe ascendant [161]. La durée du renforcement augmentait, mais non pas sa fréquence, et cela était additionné de plus longues pauses entre deux utilisations de la RE [161]. La durée de l'utilisation augmentait également en fonction de l'augmentation de la difficulté du ratio fixe ascendant, démontrant l'aspect renforçateur de l'AP [161].

### **Impact du système des opioïdes sur l'aspect addictif de la course d'endurance**

Certaines gens sont accros à la course d'endurance ou plutôt au sentiment qu'elle procure. Ce sentiment est appelé le « *runner's high* » [162]. Certains font état du "*high*" comme étant un profond sentiment de bien-être et de relaxation plutôt que d'un état euphorique à proprement dit [162]. Cet effet est associé à la libération d'endorphines et se produit suite à la pratique d'un exercice physique aérobique de très haute intensité. Selon Le Dr Levin, l'endorphine aiderait à camoufler la douleur et la fatigue qu'engendrent la pratique intense d'un exercice physique plutôt qu'à la simple induction d'un sentiment de bien-être [162]. Le fait que le *runner's high* soit seulement attribuable à la course est questionnable, néanmoins il s'agit du sentiment contextuel le plus rapporté. Il n'a pas été soulevé de façon explicite dans des contextes d'exercice aérobique tels que le cyclisme ou la nage. Par contre, ces activités sont parfois utilisées afin d'évaluer les bienfaits de l'AP sur la cognition et l'implication des différents agents moléculaires modulés par l'AP chez l'humain [163]. Bien que ce sentiment soit rapporté de différentes manières auprès de la population de coureurs et que son fondement ait créé un nuage d'arguments et de contre-arguments concernant la véracité de son existence, le "*high*" est effectivement associé à la libération d'opioïdes endogènes dans les circuits frontolimbiques [164]. Cette constatation a été faite grâce à l'emploi de tomographie avec émission de positrons, suite à la soumission à un exercice soutenu chez une cohorte de sujets sains. En effet, l'activation de ces circuits corrélait avec l'auto-proclamation d'euphorie des participants [164]. Dans une étude publiée en 2000, Lett a démontré que les effets post-contact avec une RE induisaient une PPC chez la souris,[165] et

démontra ensuite que cette préférence était atténuée suite à l'administration de naloxone, un antagoniste des récepteurs aux opiacés [166]. Ce dernier a également observé une tolérance croisée avec les effets récompensants de la morphine [156]. L'utilisation en forte intensité d'une RE entraîne des adaptations du système des opioïdes, comme il est observé chez les individus ayant une dépendance à l'éthanol [167]. L'activation de cFOS serait par ailleurs présente à très forte intensité dans les neurones exprimant la DYN dans le Nac, après trente jours d'utilisation d'une RE chez le rat Lewis [159]. En ce qui concerne les  $\beta$ -END, elles auraient un rôle à jouer dans la diminution de la sensibilité à la douleur, mais n'auraient pas à proprement dit d'impact sur l'effet récompensant de la course [152, 168], et n'aurait pas d'effet antidépresseur car non associé à la prolifération cellulaire [169]. La DYN dans le noyau caudé et le putamen est également élevée suite à l'utilisation de RE au même titre que la cocaïne et l'éthanol [170].

### **Impact du système des endocannabinoïdes sur l'aspect addictif de la course d'endurance**

La course d'endurance exerce également un effet sur le système des endocannabinoïdes. En effet, les taux plasmatiques d'anandamide sont plus élevés chez l'homme et le chien suite à une séance de course de haute intensité [171]. Les endocannabinoïdes influencent entre autre, par l'entremise de leur liaison aux récepteurs CB1 sur les terminaisons présynaptiques, la libération de GABA à certains endroits dans l'ATV, y contrôlant alors indirectement la libération de DA. Il semblerait donc que les endocannabinoïdes soient essentiel sur plusieurs aspects du *runner's high* et sur l'aspect volontaire de l'AP à proprement dit [172]. Une étude

récemment menée par Fuss et ses collègues ont de façon plus crédible, soulevé le rôle supposément indispensable des endocannabinoïdes dans le *runner's high*, et plus particulièrement dans l'effet anxiolytique et analgésique [173] et dans la plasticité hippocampale [174] y étant associé. La relation entre le système des endocannabinoïdes et des opioïdes dans le Nac servirait à amplifier l'expérience sensorielle et plaisante [175-178] et les endocannabinoïdes et les opioïdes activent qui plus est directement les neurones à DA [120, 121, 179, 180].

### **Quelques mots sur la sérotonine**

En ce qui concerne la sérotonine, l'AP aérobique augmente le transfert de tryptophane plasmatique au cerveau [181]. La sérotonine est augmentée de façon aiguë dans le striatum, l'HIPP et le mésencéphale suivant un exercice physique, concomitant avec une libération augmentée de facteur de libération de la corticotropine (CRF) [182, 183]. Les taux de sérotonine et de CRF diminuent progressivement suivant un exercice [183]. Il semble y avoir un inter-balancement temporel entre les taux de sérotonine et de DA, où une augmentation de sérotonine et une diminution de DA corrèlent avec le niveau de fatigue de l'individu suivant la pratique d'un exercice [14, 182].

## **1.4- La leptine, une hormone d'influence dans le SNC**

### **1.4.1 – Physiologie de la leptine**

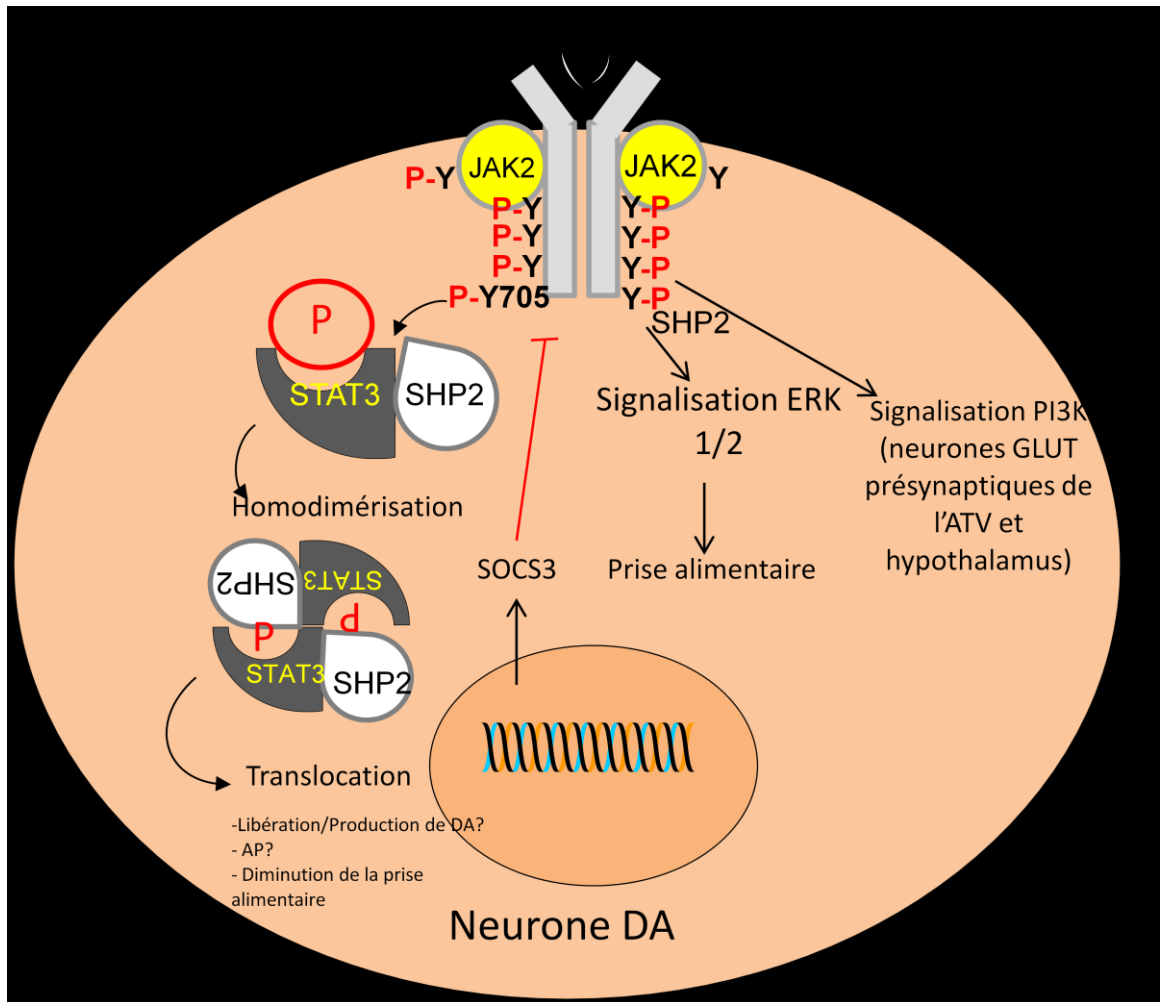
La régulation neuroendocrinologique de l'AP, plus particulièrement l'implication des hormones de l'appétit, fait l'objet d'un vif intérêt en recherche, puisque l'AP

influence l'équation de la BÉ [184]. Il est généralement accepté que l'expression des hormones orexinergiques (NPY, AgRP, ghréline) [185] et anorexinergiques (quelques exemples : leptine, insuline, adiponectine, POMC) [185] est fonction de l'intensité de l'exercice physique pratiqué [186]. Cependant, il est souvent discuté, dans la littérature, de l'effet de l'exercice sur la régulation des hormones de l'appétit et non l'inverse. À cet effet, les sections suivantes de cette revue traiteront de la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes dont les caractéristiques et l'impact sur la motivation à courir fait l'objet d'un intérêt émergeant.

La leptine est une hormone de 16 kDa tirée du gène *ob* et sécrétée par le tissu adipeux blanc [187]. Après avoir franchi la barrière hématoencéphalique, elle agit sur l'hypothalamus, afin d'informer ce dernier sur les réserves d'énergie de l'organisme [187]. La leptine est reconnue comme diminuant la prise alimentaire et augmentant la DÉ [187]. Dans l'hypothalamus, elle régule positivement l'effet anorectique des neurones POMC [188], et diminue l'effet orexigène des neurones exprimant le *Agouti-related peptide* (*Agrp*) et le *Neuropeptide Y* (NPY) [189, 190]. Le récepteur à la leptine, le *Leprb*, appartient à la classe I de la famille des récepteurs à cytokine [191, 192]. Cette forme de récepteur est reconnue comme médiant majoritairement, parmi les 6 isoformes de récepteurs à la leptine, l'activité cellulaire, et des essais pharmacologiques et transgéniques ont contribué à valider ce propos [191, 192]. Lorsque la leptine se lie au *Leprb*, une hétérogénéité dans la cascade signalétique se produit [193]. La signalisation la plus courante est la Januse kinase-STAT (JAK-STAT, et plus particulièrement la JAK-STAT3 [193]. La liaison non-covalente de la leptine au *Leprb* phosphoryle la famille de tyrosines kinase JAK2 et se résume par



une série d'autophosphorylations dont découlent deux types de signalisation différents [193]. La phosphorylation du résidu tyrosine 204 et thréonine 202 induit l'activation de la cascade ERK1/2, alors que la phosphorylation du résidu tyrosine 705 active le STAT3 [193]. Une fois phosphorylé, pSTAT3 forme un complexe homodimérique avec un autre pSTAT3, tout deux emboîtés dans la niche de deux domaines intracellulaires SHP2 [193]. Le complexe transloque dans le noyau cellulaire pour réguler la transcription génique[193]. La signalisation PI3K est également activée par la leptine, puisqu'il a été démontré qu'une inhibition de son activité empêchait la leptine de supprimer la prise alimentaire et ce, dans l'hypothalamus [194] (**Figure 3**).



**Figure 3 : Brève explication de la signalisation leptinergique dans les neurones DA avec une emphase sur la signalisation STAT3.** La phosphorylation successive de la tyrosine 705 suivant la phosphorylation successive de Jak2 active le facteur de transcription STAT3, qui s'homodimérise à l'aide de deux domaines SHP2. Le complexe transloque dans le noyau cellulaire afin de réguler la transcription génique. La prise alimentaire dans les neurones DA est également régulée par la signalisation ERK1/2. La signalisation PI3K est importante, mais n'est pas vraiment essentielle à la régulation du fonctionnement des neurones DA. Modification du schéma résumé de l'article [40]. Auteure de l'œuvre initiale : Cécile Hryhorczuk.

### **1.4.2 – Impact de la leptine sur le SR**

Leschan illustre un portrait sommaire mais complet de la distribution des fonctions de la leptine dans le SNC [195]. Le récepteur à la leptine est bien exprimé sur les neurones DA de l'ATV et de la SN, de même que les récepteurs à l'insuline, la leptine et l'insuline étant connus pour agir de façon synergistique [196]. Au-delà des propriétés anxiolytiques de la leptine [197, 198], la leptine est réputée pour être un régulateur de l'homéostasie, médiant – et la plupart du temps diminuant – le sentiment de faim à proprement dit mais également la sensibilité aux propriétés récompensantes de la nourriture. En effet, la leptine, de par son action dans l'ATV diminue les comportements de motivation alimentaire, démontré par des études de PPC et de ratio progressif, et l'inverse est observé par des études utilisant des modèles animaux transgéniques où le *Leprb* est invalidé dans l'ATV [199, 200]. Le rôle de la leptine dans l'effet – ou plutôt l'inhibition de l'effet - récompensant associé à la nourriture est donc bien connu [201], et son impact sur la suppression de l'effet récompensant associé aux drogues vient tout juste d'être allègrement établi [202]. Certaines études supposent que la leptine augmenterait la valeur de ces stimuli, mais il s'agit plus d'observations de présence concomitantes, et la corrélation observée est difficile à interpréter [203, 204]. La leptine exerce une grande influence sur le système mésolimbique et plus particulièrement le système mésolimbique dopaminergique. Hommel a démontré, grâce à de l'hybridation *in situ*, que 60% des neurones à DA de l'ATV contenaient de l'ARNm exprimant le *Leprb* [205], mais que, selon Leshan et al., le récepteur en soi ne se retrouve que sur 6 à 10% de ces neurones [195], lui conférant une sous-spécialisation dans les neurones dopaminergiques [206]. Fulton

et al. ont démontré l'induction de pSTAT3 dans les neurones DA et GABA de l'ATV, avec une parcelle de ceux-ci se projetant dans le Nac, chez des souris ob/ob et WT [184]. L'activité leptinergique dépend également en partie de la signalisation ERK1/2 dans l'ATV, et cette même signalisation semble être un médiateur critique de la prise alimentaire et de la réduction de la neurotransmission dopaminergique médiée par la leptine [207]. Il est important de considérer que la leptine régule le tonus dopaminergique de plusieurs manières, allant du contrôle de la production de la DA à sa libération et sa recapture [184, 205, 208-211]. Fulton et al. ont observé que la libération phasique de DA mesurée par voltamétrie dans le Nac était réduite chez les souris ob/ob par rapport au groupe contrôle où la sensibilité à la leptine est standard, et qu'une réduction de l'ASIC dans le LH provoquée par une restriction alimentaire chez des rats Zucker était réduite par l'administration centrale de leptine [212]. Cette observation reproduit l'effet supprimeur de la leptine observé dans une autre étude d'ASIC menée par la même équipe [213]. Il a été démontré par Hommel et al. que les neurones à DA de l'ATV contiennent des Leprb agissant selon un mécanisme JAK-STAT dépendant. Ainsi, l'injection de leptine dans l'ATV diminuait la prise alimentaire, alors qu'une invalidation du Leprb dans cette région induisait une augmentation de la sensibilité à la vue de nourriture palatable, une augmentation de la prise alimentaire en général ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice [205]. Ceci dit, la leptine est un important modulateur de la neurotransmission dopaminergique et est typiquement réputé comme diminuant la libération phasique de DA [214] en hyperpolarisant légèrement les neurones à DA de l'ATV [206]. Comme mentionné, la leptine agit selon trois cascades signalétiques différentes, mais celles qui semblent

être préconisées dans l'ATV sont ERK1/2 et STAT3, non pas PI3K/p-AKT, qui module plutôt les effets anorectiques de la leptine en agissant ailleurs dans le SNC. Un rôle présynaptique de la cascade PI3K a cependant été soulevé par l'équipe de Thompson et Borgland [215]. En effet, cette signalisation serait responsable de la diminution des courants excitateurs post-synaptiques glutamatergiques responsables de la potentialisation à long terme des neurones DA de l'ATV [215]. Davis et al. ont soulevé une dichotomie intéressante par rapport à la modulation de l'aspect homéostatique et hédonique de la nourriture par la leptine. Brièvement, une invalidation du *Leprb* dans le LH altère le métabolisme, alors qu'une invalidation dans le mésencéphale n'a pas d'effet sur la consommation calorique ou le poids en soi, mais augmente l'anticipation et la motivation en regard de l'atteinte d'une récompense et le tonus dopaminergique, en fonction de la diète [216].

#### **1.4.3 – Influence de la leptine sur l'AP**

L'impact de la leptine sur l'activité volontaire est connu, mais peu d'études se sont penchées sur l'aspect récompensant de l'AP en lien avec la leptine. Voici ce qui ressort de la littérature où les niveaux de leptine ont été évalués chez les marathoniens ainsi que les rongeurs HVR. Il est certainement avoué que la leptine exerce un effet potentialisateur chez des souris HVR et ce, lorsque nourries *ad libitum* [217] et indépendamment de la diète. Par contre, dans un contexte où les ressources alimentaires sont limitées, la leptine réduit l'APV [218-220], et cette réduction est associée au phénotype hyperactif observé dans les cas d'*anorexia nervosa* (AN) et de trouble du déficit d'attention avec hyperactivité (TDAH) [219]. Dans un même ordre d'idées, la leptine supprime l'activité locomotrice dans un

contexte de restriction alimentaire [220]. Ces résultats vont dans la même direction que ceux de Ahima, qui avait bien établi les paramètres entourant la réponse physiologique leptine-dépendante au jeûne [221].

La leptine est reconnue pour supprimer la prise alimentaire et augmenter la DÉ chez les souris ob/ob et chez les humains ayant une déficience en leptine [222, 223]. Morton et al. ont établi une série de phénotypes murins, où des souris ob/ob et contrôles étaient soit dans des conditions *ad libitum* ou de jeûne, avec ou sans administration de leptine. La leptine réduit l'APV chez les modèles contrôles et ob/ob soumis à une restriction alimentaire, alors que dans les mêmes conditions sans administration de leptine, l'APV est augmentée et cette augmentation est plus prononcée chez les souris déficientes en leptine [218]. Au stade *ad libitum* par contre, la leptine est un promoteur de l'activité physique spontanée et volontaire chez le rat [224] ainsi que chez un modèle de souris HVR et soumis à une diète riche en gras [217]. Les niveaux de leptine suivant un jeûne corrélaient également de façon inverse avec la DÉ associée à l'AP chez les humains et les modèles animaux semi-restreints [225, 226]. Qui plus est, les taux de leptine sont inversement proportionnels à la performance de course des marathoniens [227] ainsi que chez les modèles de souris HVR [228].

L'injection de leptine directement dans l'ATV de rats induit une phosphorylation importante de STAT3 [205], et il a été démontré que STAT3 régule crucialement la prise alimentaire, tant dans l'ATV que dans l'hypothalamus [229, 230]. En effet, une inhibition de la phosphorylation de STAT3 dans l'ATV provoque un phénotype

hyperphagique chez la souris [231]. Cependant, Hommel et al. ont distingué deux phénotypes chez leur modèle de rats invalidé pour le *Leprb* spécifiquement dans l'ATV, soit qu'il augmentait significativement la prise alimentaire, mais augmentait également l'activité locomotrice [205]. Suite à cela, Scott et al. ont effectué une étude des plus exhaustives sur la distribution et fonction du *Leprb* à travers le cerveau, démontrant que la pSTAT3 induite par la leptine – qui cible les neurones GABA et DA de l'ATV - n'est détectée que dans une parcelle des neurones DA notés positifs pour le *Leprb* [232].

### **Objectifs**

L'impact de la leptine sur l'aspect récompensant de la course d'endurance est connu, mais demande à être approfondi. Vue les observations suivantes, soit que 1) la leptine module le SR et agit directement sur les neurones à DA, 2) - la leptine est un important modulateur de la signalisation dopaminergique 3) la leptine exerce une influence notoire sur l'APV 4) l'invalidation de pSTAT3 dans l'ATV induit deux phénotypes distincts et que 5)- la détection de pSTAT3 n'est observée que dans une parcelle des neurones DA évalués positifs pour le *Leprb*, nous conférons à STAT3 des caractéristiques potentiellement uniques en regard de la neurotransmission dopaminergique du système mésolimbique et de son influence sur les propriétés récompensantes de l'APV. Nous avons donc généré un modèle invalidé pour STAT3 dans les neurones DA, et analysé plusieurs paramètres tels qu'indiqués dans l'article que nous avons publié tout récemment (voir annexe), incluant la DÉ, la prise alimentaire compulsive, l'expression génique de l'intégrité du système mésolimbique et le tonus dopaminergique.

## **Chapitre 2 : MÉTHODES**

Veillez noter que les procédures expérimentales exposées ci-contre se rapportent aux méthodes décrites dans l'article '*Leptin suppresses the rewarding effects of running via STAT3 signalling in dopamine neurons*' se trouvant en annexe [40]. La contribution des autres auteurs de l'article y est spécifiée.

### **2.1- Animaux et stratégie de reproduction**

L'intégralité des expériences effectuées chez nos modèles animaux étaient en accord avec les membres du Comité Institutionnel de Protection des animaux (CIPA) du Centre de Recherche du CHUM. Nous avons utilisé un modèle de souris mâle C57BL/6 invalidé pour le gène STAT3 dans les neurones DA. La technique Cre-LoxP a été employée, l'enzyme Cre recombinase étant sous l'influence du promoteur DAT. Les souris étaient d'abord flanquées de deux sites LoxP à l'exon 22, représentant la tyrosine 705, essentielle à la phosphorylation et activation de STAT3. Ces souris nous ont été fournies par Dr. Shixuo Akira (Osaka, Japon ) [233]. Les souris femelles homozygotes pour l'allèle STAT3 flanquée ont été croisées avec des souris mâles hétérozygotes pour le transgène DAT::Cre (B6.SJL-*Slc6a3tm1.1(cre)Bkmn371* /J) [234]. La Cre recombinase retire le gène flanqué uniquement dans les neurones DA dû à l'influence du promoteur DAT. Le groupe de souris contrôles n'a été soumis à aucune invalidation embryonnaire, ayant un génotype sauvage pour la Cre recombinase et sauvage, hétérozygote ou homozygote pour les sites loxP. Les souris sont sevrées à 21 jours, placées dans des pièces à température, humidité et pression contrôlées et en cycle inversé 12h/12h. Toutes les expériences ont été



menées durant la phase noire/d'activité des souris et le poids corporel était mesuré occasionnellement, plus précisément lorsque les expériences requéraient une restriction alimentaire légère de 10%, ainsi qu'avant et après leur entrée dans les cages métaboliques (détails à la section suivante).

## **2.2- Mesures calorimétriques indirectes avec le CLAMS**

Chaque souris (n=10-12/groupe) a été placée dans une chambre métabolique nommée le *Comprehensive Lab Animal Monitoring System*, provenant de la plateforme de phénotypage comportemental des rongeurs (CLAMS; *Columbus Instruments*) pour une période de 48 à 72 heures où elles avaient libre accès à une diète standard ainsi qu'à l'eau. Ces chambres sont en réalité des cages prismatiques rectangulaires connectées à un ordinateur utilisant le programme de captage Oxymax/CLAMS et d'analyse CLAX. Les souris étaient nourries *ad libitum* et un distributeur d'eau était connecté à chacune des cages de plexiglass. Entre autre, les mesures calorimétriques (prise alimentaire, poids), les échanges d'air (interne/externe, expiré/inspiré), la pression interne et externe de l'appareil, la thermorégulation, l'activité ambulatoire en trois dimensions ainsi que le rythme cardiaque peuvent être mesurés. La production de chaleur, définie par le nombre de calories brûlées par heure en fonction du poids de chaque souris, l'activité ambulatoire ainsi que le RER, soit le ratio entre la quantité de dioxyde de carbone produite et d'oxygène utilisée, rapportant l'oxydation plus élevée des hydrates de carbone (valeur se rapprochant de 1.0) ou des acides gras (valeur oscillant autour de 0.7), furent plus précisément captés et analysés.

### **2.3- Mesure de l'activité locomotrice suite à l'injection d'un agoniste D1R**

La quantité réduite de TH et de D1R démontré par les Western Blot, de même que la libération phasique réduite de DA dans l'étude de voltamétrie nous ont amené à sonder la sensibilité des D1R post-synaptiques. L'activité ambulatoire sur le plan horizontal des souris (n=6-8 /groupe) a été mesurée une heure durant et ce, pendant la phase blanche de leur cycle circadien, correspondant à leur phase de sommeil. L'injection du psychostimulant a été effectuée à ce moment dans le but d'observer l'activité locomotrice induite seulement et uniquement par l'agent pharmacologique. Les souris ont d'abord été soumises à une période d'habituation de 24 heures dans le CLAMS. Les souris ont donc reçu, durant la phase blanche du cycle circadien (aux alentours de 3 heures am) une dose intrapéritonéale (ip) de 0.1 mg/kg (dilué dans 0,9% de solution saline) de l'agoniste D1R Chloro-APB-hydrobromide (SKF82958-hydrobromide) (*Santa Cruz Biotechnology, CA*) avant la mesure de l'activité ambulatoire.

### **2.4- Réinsertion du gène STAT3 dans les neurones DA du système mésolimbique dopaminergique par l'injection stéréotaxique d'un adénovirus associé (AAV) utilisant la stratégie FLEX**

#### **2.4.1 – Détails de la stratégie FLEX**

La stratégie *Flip excision* (FLEX) utilise une séquence inversée comportant le gène d'intérêt sous l'état inactif ("off"). La recombinaison est dépendante de la Cre recombinase, présente normalement dans les cellules où l'invalidation primaire a eu

lieu. Le gène d'intérêt est flanqué de deux sites lox hétérotypiques et positionnés de façon antiparallèle. La séquence, au contact de la Cre, est d'abord inversée afin que la recombinaison ait lieu ("*off*" → "*on*"). Une fois le gène réinséré dans le code génétique de la cellule hôte, les sites lox sont chacun excisés. Le gène est alors flanqué de deux sites lox hétérotypiques en conformation orthogonale, rendant impossible d'autres processus de recombinaison [235, 236]. Tel qu'indiqué dans l'article en annexe, le vecteur DIO (*Double Inverted Orientation*) est une séquence bicistronique IRES codant pour le gène STAT3 et le mCherry avec un promoteur synapsine, flanqué d'un site loxP et lox 2272 (Virovek, Inc.). Pesant 4,9 kb, le vecteur a été inséré dans un adénovirus associé de type 9.

#### **2.4.2 – Procédures entourant l'injection stéréotaxique de l'AAV**

Les souris sont d'abord anesthésiées à l'isoflurane 3% avec 0,8 L/min d'oxygène et ce, pour une période de 4 minutes. Elles sont ensuite placées sur un appareil de chirurgie stéréotaxique. La quantité d'isoflurane fournie varie selon l'état de l'animal, mais le pourcentage est en général fixé à 1,5%. Du carprophène (0,016cc/g, 16µL/g) et de la saline (0,5 cc, 500µL) sont injectés en sous-cutané après l'anesthésie. Les coordonnées du bregma et du lambda sont déterminées au moyen d'un atlas du cerveau [237] et, à partir de ces chiffres, les points de référence de l'ATV peuvent être indiqués. Les coordonnées de l'ATV sont : -3.4 mm antéropostérieur, +/- 0,4 mm médiolatéral à partir du sinus central, et -4,9 mm dorsoventral. L'injection du virus est effectuée à l'aide d'une seringue de 1 mL (*Neuro Syringe 7000.1 series, Hamilton*) reliée à un micropositionneur et une roue d'injection manuelle (*Kopf*). Un volume de 0,5 µL de la solution virale est injecté dans chacun

des hémisphères. Toutes les souris reçoivent des injections de saline (0,5 cc, 500 µL) et de carprophène (0,016 cc/g, 16 µL/g) chaque jour pendant 3 jours suivant la chirurgie, en plus d'une bouteille d'eau supplémentaire et de nourriture humidifiée dans chacune des cages, et la stabilité du poids des souris est vérifiée quotidiennement. La récupération ainsi que le temps d'action optimal du virus est fixée à 4 jours.

## **2.5- Mesure de l'activité physique volontaire**

Les souris (n=6-7/groupe) ont eu libre accès à une RE 4 jours après la chirurgie et ce, pour une période de 4 semaines. Les rongeurs ainsi que les roues étaient placées dans des cages de rats. Aucun enrichissement environnemental n'était présent mis à part la RE, et les souris étaient nourries *ad libitum* sur diète standard. Les roues en question (*Med 429 Associates, Inc., VT, USA*) fonctionnent sans fil. Le nombre de révolutions de chacune des roues est capté via un logiciel informatique (*Med Associates Inc., St. Albans, VT, USA*) positionné non loin des cages contenant les roues, afin que la détection du nombre de révolutions soit optimale. Sachant qu'une révolution de roue équivaut au parcours de 36,9 cm, il est alors possible de convertir le nombre de révolutions de roues par jours en kilomètres parcourus sur une période de 24 heures.

## **2.6- Validation de l'infection par l'AAV par immunohistochimie**

### **2.6.1- Sacrifices et coupes histologiques au microtome**

Du *Phosphate Buffer Serum* (PBS) 1X et de la formaline 10% (*Chaptec*) sont préparés. Environ 60 mL de chaque produit est versé dans sa seringue respective, le tout relié à une aiguille 30G. L'animal est déposé dans une boîte de styromousse contenant plusieurs gaz stériles imbibés d'isoflurane pendant environ 1 minute. Les pattes sont ensuite fixées, et après s'être assuré que l'animal ne présente aucun réflexe de douleur, la décapitation a lieu, jusqu'à en atteindre le cœur. L'aiguille est insérée dans le ventricule gauche, puis l'oreillette droite est ensuite coupée. Le PBS circule en premier lieu, jusqu'à ce que les poumons deviennent blancs. Cette observation est un signe que la souris s'est vidée de son sang. Le transfert se fait ensuite à la formaline 10%, jusqu'à ce que les organes soient fixés ou rigides. Le cerveau est aussitôt prélevé et submergé dans la formaline 4% pour une période de 24h. Le cerveau est ensuite transféré dans une solution de saccharose/PB 30% m/v (1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pendant environ 24 heures à 4°C, ou jusqu'à ce que le cerveau ait coulé au fond de la fiole de liquide. Après avoir trempé dans de l'isopentane à -55°C, le cerveau est conservé dans du papier d'aluminium à -80°C. Les coupes histologiques au microtome (*Leica*, SM2000T) sont effectuées à 30 µm d'épaisseur et sont utilisées pour l'immunohistochimie et la microscopie. Chaque tranche est déposée dans du PBS 1X sous forme de triplicatas. Les tranches sont transférées dans des fioles contenant une solution antigel (125 mL glycerol, 150 mL

éthylène glycol, 225 mL PBS 1X) et conservées à -20°C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées.

### **2.6.2 – Immunohistochimie et microscopie**

Pour l'immunohistochimie, les tranches de cerveaux sont d'abord soumises à 6 lavages de 10 minutes au PBS 1X afin de se départir de toute trace d'antigel. Les tranches de cerveau sont ensuite soumises à un blocage de protéines non-spécifiques à l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante. La solution de blocage contient du NGS (*normal goat serum*) dans 8 mL de PBT (8mL par puits) (250 µL de Triton et 240 mL de PBS 1X), de façon à obtenir une concentration de NGS de 3%. Les coupes de cerveau sont ensuite transférées dans les puits contenant l'anticorps primaire, anti-dsRed (1:1000; rabbit polyclonal; Rockland, Inc. PA, USA) et anti-TH (1:1000, mouse monoclonal Supplemental Text 3 Millipore, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) étant dilués dans la solution de blocage, puis placées à 4°C sous agitation pour la nuit. Après une série de 6 lavages au PBS 1X 24 heures plus tard, les tranches baignent pendant 2 heures sous agitation à température ambiante dans l'anticorps secondaire, consistant en 2 mL de AlexaFluor 488 anti-mouse pour la TH et 568 anti-rabbit pour le dsRed 1 :200. L'immunohistochimie se termine par une autre série de 6 lavages au PBS 1X.

Les tranches de cerveau sont ensuite placées sur des lames microscopiques selon leur position coronale, en conservant un certain ordre de grandeur (antérieur vers postérieur). Environ 3 gouttes de DAPI (*Vector, Vectashield*) sont déposées sur les lames afin de colorer les cellules, précédant l'apposition de la lamelle. Les lames

sont conservées au réfrigérateur. L'observation des lames au microscope (brand) se fait dans le noir et en utilisant le programme de traitement d'image Carl ZEISS ZEN.

## **2.7- Mesure du comportement de recherche compulsive de nourriture : test de suppression de la prise alimentaire grâce à la présence d'un stimulus aversif**

Ce protocole est inspiré des articles suivants [238-240]. Les souris (n=7/groupe), suite à une légère restriction alimentaire de 10%, sont introduites dans les mêmes chambres opérantes normalement utilisées pour les expériences de conditionnement opérant (*Med associate-Modular test Chamber*) (Base : 53,3 cm x 34,9 x 1,3 cm; intérieur : 21,6 cm x 17,8 cm x 12,7 cm; extérieur, 24,1 cm x 20,3 cm x 18,4 cm). Premièrement, elles ont l'accès libre à une des boulettes de saccharose (3,60 kcal/g, 2,36 kcal provenant des hydrates de carbone) présentée dans un petit réceptacle de métal et ce, pour une durée de 30 minutes. La nourriture est pesée avant et après la période d'accès libre. Toutes les souris ont ensuite accès quotidiennement à la diète palatable pour une période de 30 minutes, jusqu'à ce que la prise alimentaire soit stable (moins de 10% de variation dans la consommation quotidienne de saccharose), ce qui peut prendre de 5 à 7 jours. Les animaux sont ensuite sujets à 4 sessions (1 session/jour) de conditionnement associatif dans les chambres opérantes. Durant ces sessions, les souris ont accès à la nourriture palatable pour une durée de 30 minutes. Pendant les 10 premières minutes, un stimulus conditionnel, correspondant à la présence d'une source lumineuse, est présenté. La lumière s'éteint ensuite pour les 10 minutes suivantes, puis se rallume

pour les 10 dernières minutes de la séance. Les souris se voient administrer de petits choc électriques uniquement lorsque la lumière est allumée (0.5 à 0.7 mA pendant 1.0 sec; 10 stimulations à intervalles d'1 min). Les chocs sont administrés aux pattes des souris. La source électrique externe délivre donc le choc au niveau de la grille de métal servant de plancher sur lequel les souris se déplacent. Le jour du test, soit le cinquième jour, les souris reçoivent un total de 5 chocs électriques en présence de lumière pendant 5 minutes. Finalement, après cette période initiale de 5 minutes, toutes les souris ont accès pendant 30 minutes à la nourriture palatable, avec les mêmes intervalles de présence de source lumineuse que pendant la période de conditionnement (10 minutes allumée, 10 minutes éteinte, 10 minutes allumée), sans délivrance de choc. Dans le cas d'un phénotype compulsif, aucune différence dans la prise de saccharose ne serait observée le jour du test par rapport à la prise basale, contrairement à un phénotype non compulsif.

## **2.8- Vérification de l'expression de marqueurs des systèmes opioïdes et endocannabinoïdes par *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)**

Les souris sont transférées dans une boîte de plexiglas connectée à deux tubes fournissant de l'isoflurane (4%) (*Forane, Baxter corp.* 100%v/v) et de l'oxygène (1L/min). Après 1 minute d'exposition, la tête des souris est coupée sur-le-champ. Le cerveau est ensuite prélevé et plongé dans un béccher en métal contenant de l'isopentane à -55°C pendant approximativement 8 secondes. Tous les cerveaux sont conservés dans du papier d'aluminium sur glace carbonique, puis ensuite entreposés dans un congélateur à -80°C, jusqu'à leur utilisation.



Une coupe des cerveaux est préalablement faite au cryostat (*Leica CM3050s*) à -15°C. Les tranches de cerveaux sont d'une épaisseur de 300 µm. Après avoir déposé les tranches sur les lames, le Nac ainsi que l'ATV sont prélevés à l'aide d'un appareil muni d'un ressort permettant de faire des punchs de tissu. Le prélèvement est fait selon des points de repères, à l'aide d'un atlas du cerveau [237].

L'extraction de l'ARNm du Nac et de l'ATV des souris (n=8/groupe) utilisant la méthode Trizol a permis d'utiliser 700 ng d'ADNc pour le RT-PCR. Les échantillons étaient dilués 1/10. Le gène de référence était la cyclophiline. Les marqueurs opioïdes mesurés étaient la  $\beta$ -END, la prépro-ENK, la prépro-DYN, ainsi que le KOR, MOR et le DOR. Les marqueurs des endocannabinoïdes étaient le récepteur CB1, *Alpha Bêta Hydrolase Domain 6* (ABHD6), *Fatty acid amide hydrolase* (FAAH), et *Monoacylglycérol lipase* (MAGL). Afin de crédibiliser les résultats obtenus en immunohistochimie de la validation de l'infection virale, l'expression de STAT3 a été mesurée dans l'ATV des souris injectées à l'AAV-DIO-FLEX. La liste des amorces se trouve dans l'article, mais également exposée ci-bas dans le **tableau 1**. Les résultats ont été normalisés à ceux de la cyclophiline.

**Tableau I :** Liste des amorces utilisées dans l'évaluation de l'intégrité du modèle STAT3DAT-KO par la mesure de l'expression des marqueurs du système des opioïdes et des endocannabinoïdes dans le Nac et le VTA ainsi que dans la validation de l'infection à l'AAV-DIO-FLEX dans l'ATV.

<b><u>Marqueur</u></b>	<b><u>Amorce sens (5'→3')</u></b>	<b><u>Amorce antisens (3'→5')</u></b>
<b>Cyclophiline</b>	GCTTTTCGCCGCTTGCTGCA	TGCAAACAGCTCGAAGGAGACGC-
<b>MOR</b>	ACAGGCAGGGGTCCATAGAT	GTGATGATGAGGACCGGCAT
<b>KOR</b>	TGATCCTGCGCCTGAAGAGT	ATGCGGCGGAGATTTTCG
<b>DOR</b>	AAGGCTGTGCTCTCCATTGAC	TGTAGCGGTCCACGCTCAT
<b>Prépro DYN</b>	GCGTGGTCCAGGCTGATG	AGGCAGTCCGCCATAACATT-
<b>Prépro ENK</b>	AGAAGCGAACGGAGGAGAGAT	TTCAGCAGATCGGAGGAGTTG
<b>β-END</b>	GCCTTTCCCCTAGAGTTCAA	GAGGTCATGAAGCCACCGTAA
<b>CB1R</b>	GTGCTGTTGCTGTTCAATTGTG	CTTGCCATCTTCTGAGGTGTG
<b>ABHD6</b>	ACTTGGTCTGTGTGGACATGC	GTGCCTATAAGGTGAAAGGGC
<b>MAGL</b>	GTGCCTACCTGCTCATGGAAT	GAGGACGGAGTTGGTCACTTC
<b>FAAH</b>	GTATCGCCAGTCCGTCATTG-	GCCTATACCCTTTTTTCATGCCC
<b>STAT3</b>	CATTGACCTGCCGATGTCCC	TCAAACGTGAGCGACTCAAAC

## 2.9- Statistiques

Le logiciel de traitement de données *Graph Pad Software* v5 a été utilisé. Pour la production de chaleur, le RER, l'injection de l'agoniste D1R et le nombre de révolutions sur les REs, un test statistique ANOVA sur deux facteurs avec test post-

hoc de Bonferonni a été utilisé, alors que pour le test de suppression de la prise alimentaire, le RT-PCR, la distance parcourue en kilomètres et l'aire sous la courbe de l'agoniste D1R, un test T non pairé a été employé. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- erreur standard de la mesure (moy +/- ESM) et une différence entre deux résultats où la valeur  $p \leq 0,05$  est considéré comme statistiquement significative (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

## **Chapitre 3 : Résultats**

Il est possible de retrouver une analyse complète des résultats de l'article "*Leptin suppresses the rewarding effects of running via STAT3 signalling in dopamine neurons*" dont l'adresse hyperlien est située en annexe.

### **3.1- L'invalidation de STAT3 dans les neurones DA influence les paramètres métaboliques de base.**

Vue l'absence de différence entre les deux groupes pour le RER et la production de chaleur et ce, malgré une DÉ plus élevée chez les KO, un nombre plus élevé d'animaux par groupe a été utilisé et ce, afin d'augmenter la puissance statistique (n=14-16/groupe au total), et chez qui ces paramètres ont été mesurés avant de percevoir une différence significative dans le poids. Si l'on se réfère à l'article, on constate que la différence de poids entre les STAT3<sup>DAT KO</sup> et les contrôles (Article : Figure 1-A) est significative à compter de 19 semaines d'âge, due à une activité locomotrice spontanée (Article : Figure 1-G) et volontaire (Article : Figures 1-H et I) plus élevée chez les STAT3<sup>DAT KO</sup>. Ce niveau d'activité plus élevé est reflété par une masse adipeuse réduite chez les STAT3<sup>DAT KO</sup> (Article : Figure 1-B) en plus d'une efficacité métabolique augmentée (Article : Figure 1-D), se résumant au ratio entre le gain de poids corporel et la quantité de calorie consommée et indicateur de la DÉ. Les Stat3<sup>DAT KO</sup> dépensent donc plus d'énergie par rapport à leur prise alimentaire. Tel que représenté dans la **figure 4 A et B** de ce mémoire, la production de chaleur et le RER ne varient pas entre les groupes, donc ne sont pas des marqueurs influencés par le phénotype des STAT3<sup>DAT KO</sup>.

### 3.2- L'invalidation de STAT3 spécifiquement dans les neurones DA réduit la neurotransmission dopaminergique

Au-delà des mesures voltamétriques démontrant une libération stimulée phasique réduite de la DA dans le NAc, en plus d'une présence intracellulaire de TH et D1R diminuées (Article : Figures 4-A-D), l'intégrité des fonctions dopaminergiques postsynaptiques a été évaluée par un essai pharmacologique. Considérant que la présence du D1R est réduite, on devrait également observer, suite à l'injection d'un agoniste de ce récepteur, une réduction de l'activité locomotrice induite par la drogue. Ainsi, l'injection ip de l'agoniste D1R rend compte d'un effet psychomoteur significativement plus bas chez les  $STAT3^{DAT\ KO}$  comparativement au groupe contrôle, démontré par une analyse de variance à deux facteurs (temps et traitement) (two way ANOVA) (**Figures 5-A et B**). Un effet significatif de groupe ( $F=6.26$  [1, 12],  $p=0,03$ ) et de temps ( $F=27.74$ , [12, 144],  $p<0,0001$ ) sont respectivement responsables de 4,93% et 58,05% de la variance totale. L'interaction groupe-temps n'est pas significative ( $F=1.37$  [12, 144],  $p=0,2$ ), mais un test post-hoc de Bonferonni rend compte de variations temporellement spécifiques, révélant plus précisément une différence statistiquement significative ( $p\leq 0,05$ ) à 100 minutes post-injection, soit 20 minutes après l'effet psychostimulateur maximal de l'agoniste D1R. Ces résultats abondent dans le même sens que l'étude de voltamétrie et de *Western blot*, et appuient l'observation suivante, soit l'absence d'effet sensibilisateur démontré par l'injection unique et répétée ip d'amphétamine (1mg/kg) chez les  $STAT3^{DAT\ KO}$  (Article : Figure 4-G et H). STAT3 dans les neurones DA est donc un modulateur important de la neurotransmission dopaminergique.

### **3.3- L'invalidation de STAT3 dans les neurones DA altère le système des opioïdes**

Les systèmes des opioïdes et endocannabinoïdes entretiennent une étroite relation avec le système mésolimbique dopaminergique et influencent indirectement son activité [120, 121, 179, 180]. Il est donc raisonnable de penser que ces derniers aient adapté leur expression dû à l'invalidation embryonnaire de STAT3 dans les neurones DA, affectant non seulement leur intégrité, mais affectant également indirectement la libération de DA. Ceci dit, l'expression des marqueurs des endocannabinoïdes ne varie pas entre les deux groupes dans le Nac et l'ATV (**Figures 6-A et B**), alors que pour les opioïdes, le précurseur de la DYN, la préproDYN, est significativement réduite dans l'ATV des STAT3<sup>DAT KO</sup> (**Figure 6-A**). Une tendance ( $p=0.06$ ) vers une expression plus élevée du DOR est observée dans le Nac des STAT3<sup>DAT KO</sup> (**Figure 6-B**), conférant à STAT3 un rôle dans l'intégrité du système des opioïdes.

### **3.4- La recherche compulsive de nourriture ne fait pas partie du phénotype des STAT3<sup>DAT KO</sup>.**

L'idée d'utiliser un test de suppression de la prise alimentaire par conditionnement associatif vise à valider si l'activité locomotrice et volontaire élevée des STAT3<sup>DAT KO</sup> (Article, Figures 1-D-F) est due non seulement à un phénotype généralement compulsif, mais également associée à la recherche de ressources alimentaires, dans un contexte où ces dernières font face à une légère restriction alimentaire. L'idée est également vérifier l'impact de STAT3 dans les neurones DA

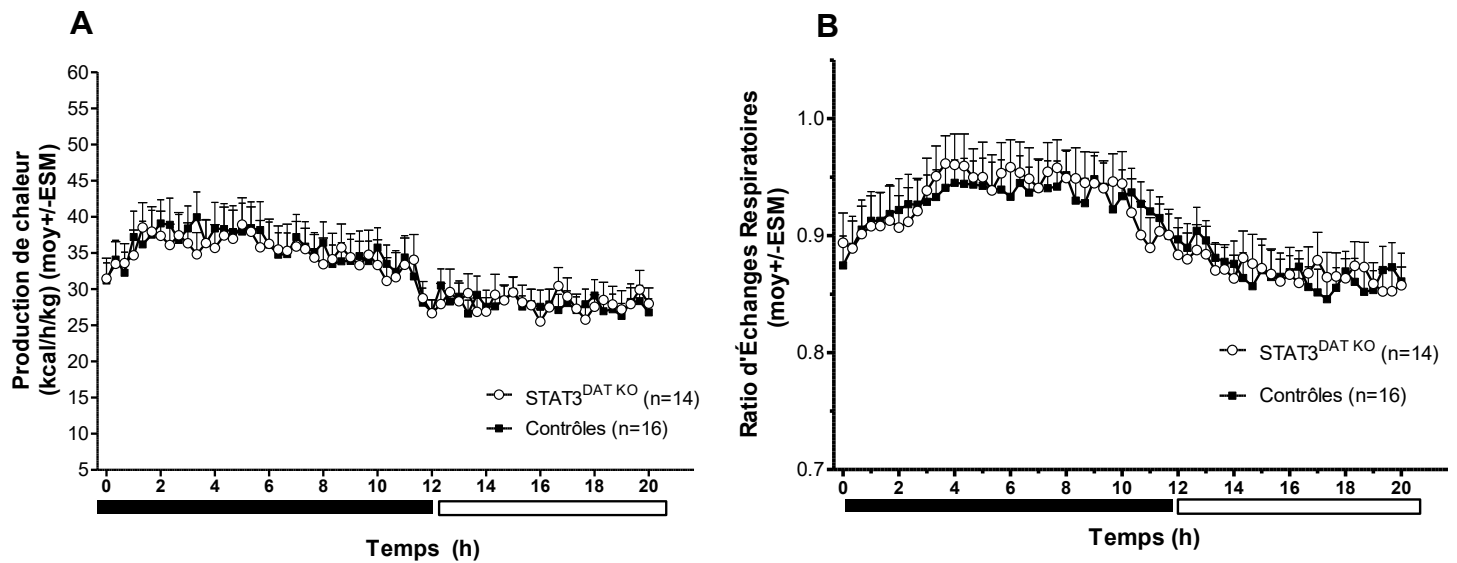
sur les effets anorectiques de la leptine. La **figure 7-A** est illustrée sous forme de pourcentage de suppression de la prise alimentaire par rapport à la consommation basale. La **figure 6-B** expose la différence (en grammes de saccharose consommés) entre la consommation basale de saccharose et la consommation le jour du test. La prise alimentaire étant supprimée chez les deux groupes, les  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$  ne présentent pas un phénotype compulsif envers la consommation de nourriture, malgré qu'elles aient été légèrement restreintes. Ces résultats sont également une preuve supplémentaire que les effets anorectiques de la leptine sont régulés indépendamment de STAT3 dans les neurones DA, tel qu'illustré dans l'article (Article : Figures 2-A-D, F)

### **3.5- La recombinaison de STAT3 dans les neurones utilisant la technique FLEX normalise l'APV chez les $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$ .**

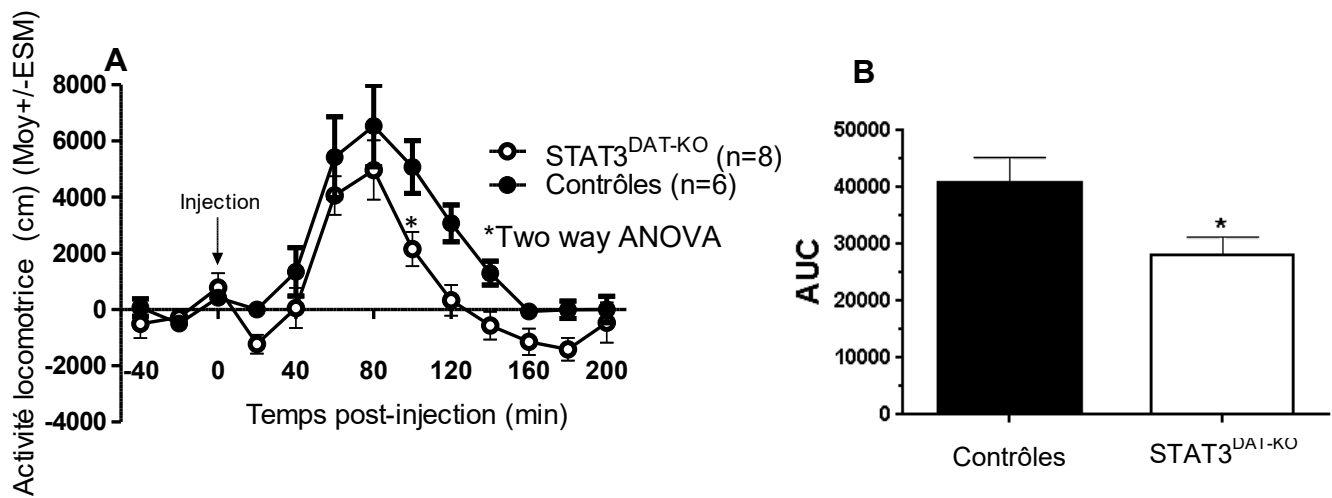
La stratégie FLEX expliquée à la **figure 8** a pour but de vérifier la réversibilité du modèle  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$  en regard de l'activité volontaire augmentée et, conjointement, de l'intégrité du système dopaminergique. En effet, la leptine exerce un effet trophique important sur le système mésolimbique dopaminergique [184, 231, 241]. Nous avons émis l'hypothèse que l'injection de l'AAV dans l'ATV normaliserait l'activité physique des  $\text{STAT3}^{\text{DAT-KO}}$  à celle du groupe contrôle, et que la recombinaison encourue par le grand volume d'injection de l'AAV (0,5  $\mu\text{L}$  par hémisphère) rendrait compte de façon plus éloquente l'impact de STAT3 dans le système mésolimbique dopaminergique sur l'APV. L'efficacité de l'infection virale observée à la **figure 9** reflète la réversibilité de notre modèle expérimental tel qu'illustré aux **figures 10 et**

**11.** En effet, les STAT3<sup>DAT KO</sup>, courant initialement plus de 11 km/jour (Article, Figures 1-H, I), ont maintenant une activité volontaire normalisée à celle des contrôles, voire même légèrement réduite de part l'expression ARNm relative de STAT3 dans l'ATV des STAT3<sup>DAT-KO</sup> FLEX, identique à celle des contrôles (**Figure 10**). Cette dernière semble même être légèrement plus élevée. Notre modèle animal embryonnaire est donc intègre et non biaisé par des processus adaptatifs reliés à la croissance à proprement dit, l'absence de la signalisation STAT3 dans les neurones DA ou aux propriétés trophiques de la leptine.

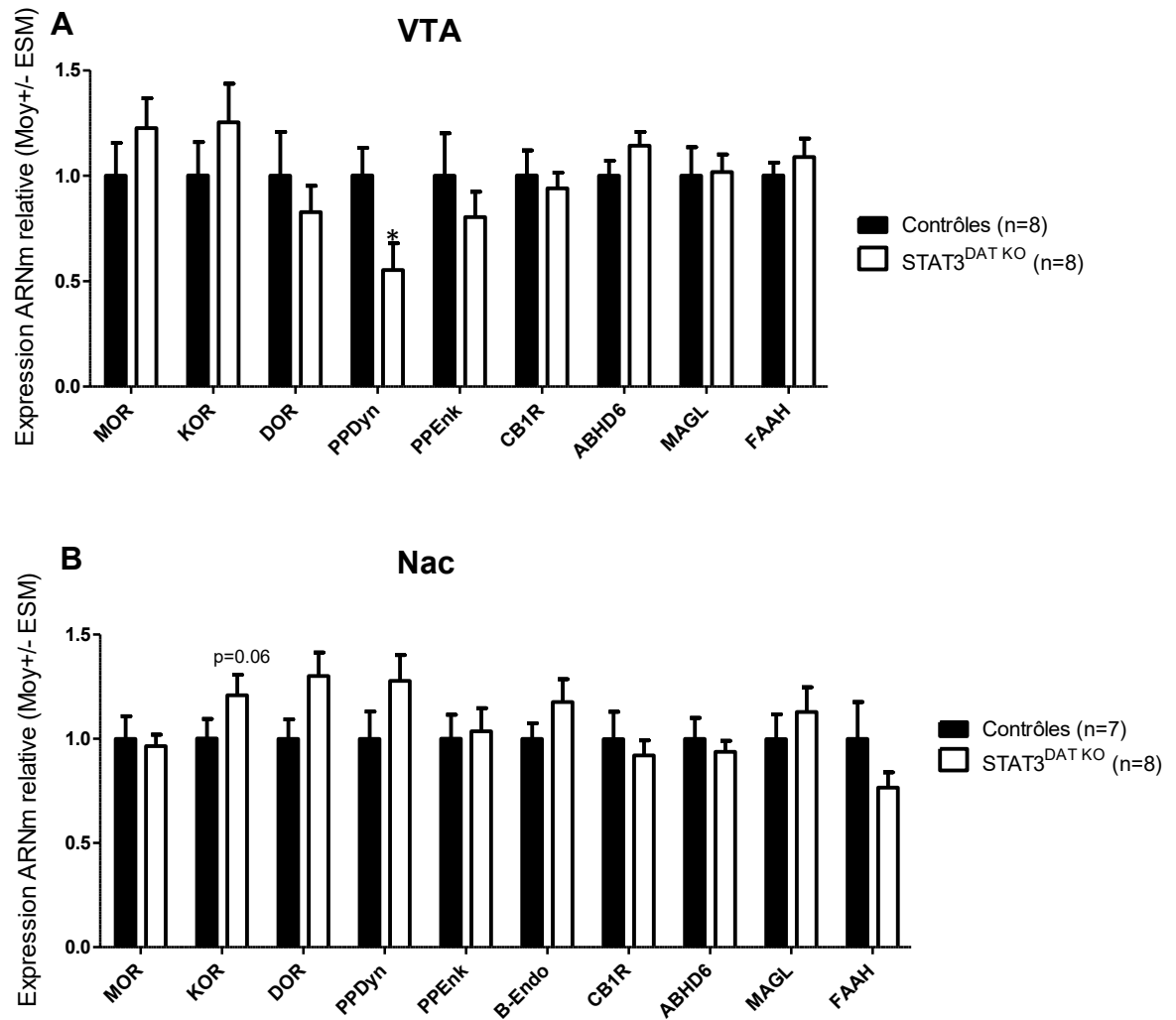




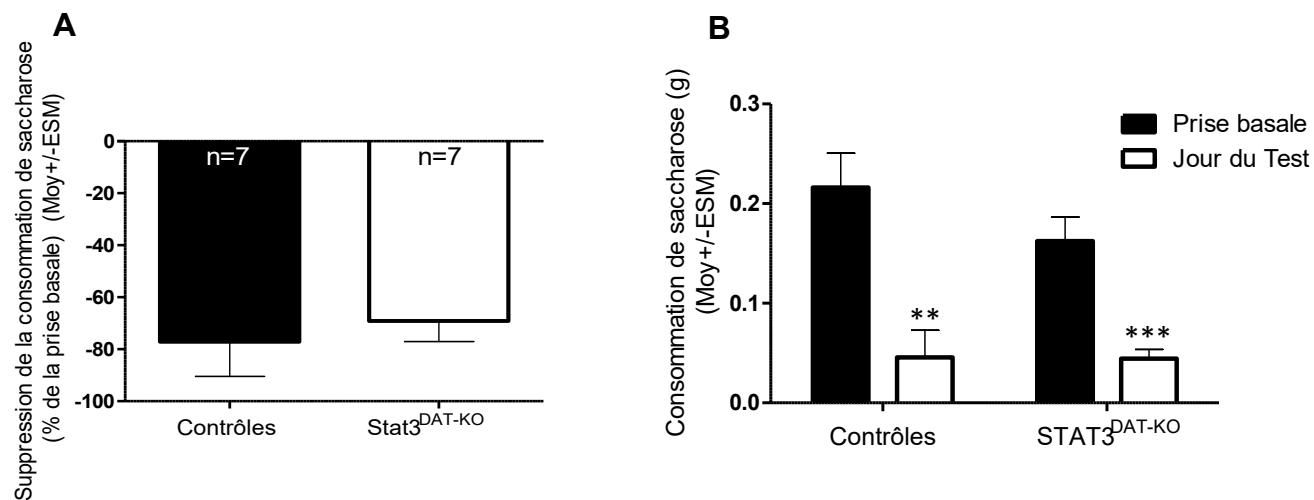
**Figure 4 :** Paramètres métaboliques évalués par les chambres CLAMS. A- Production de chaleur sur une période de 20 à 24 heures. B-RER également évalué sur une période de 20 à 24 heures. Les premiers douze heures correspondent à la phase d'activité (noire) des souris alors que les dix heures qui suivent correspondent à la phase de sommeil (blanche). Moy $\pm$ - ESM.



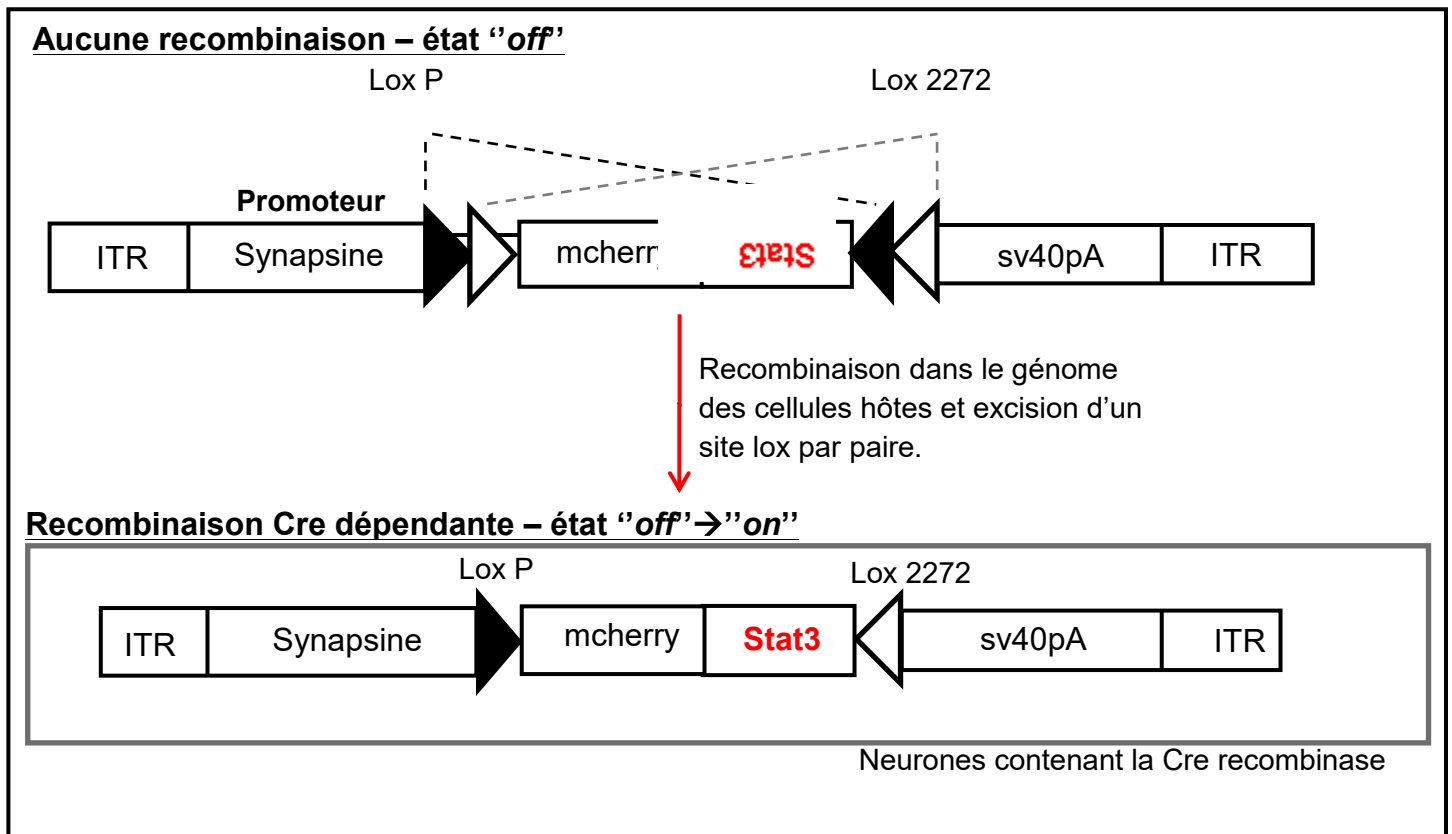
**Figure 5 : Activité ambulatoire suite à l'injection ip de l'agoniste D1R.** A-Activité locomotrice sur le plan horizontal mesurée sur 200 minutes suivant l'injection ip de l'agoniste D1R (0,1 mg/kg). B-Aire sous la courbe représentant l'activité locomotrice moyenne de chaque groupe et tirée de la figure 5A. Moy+/-ESM \*p≤0.05 par rapport au contrôle.



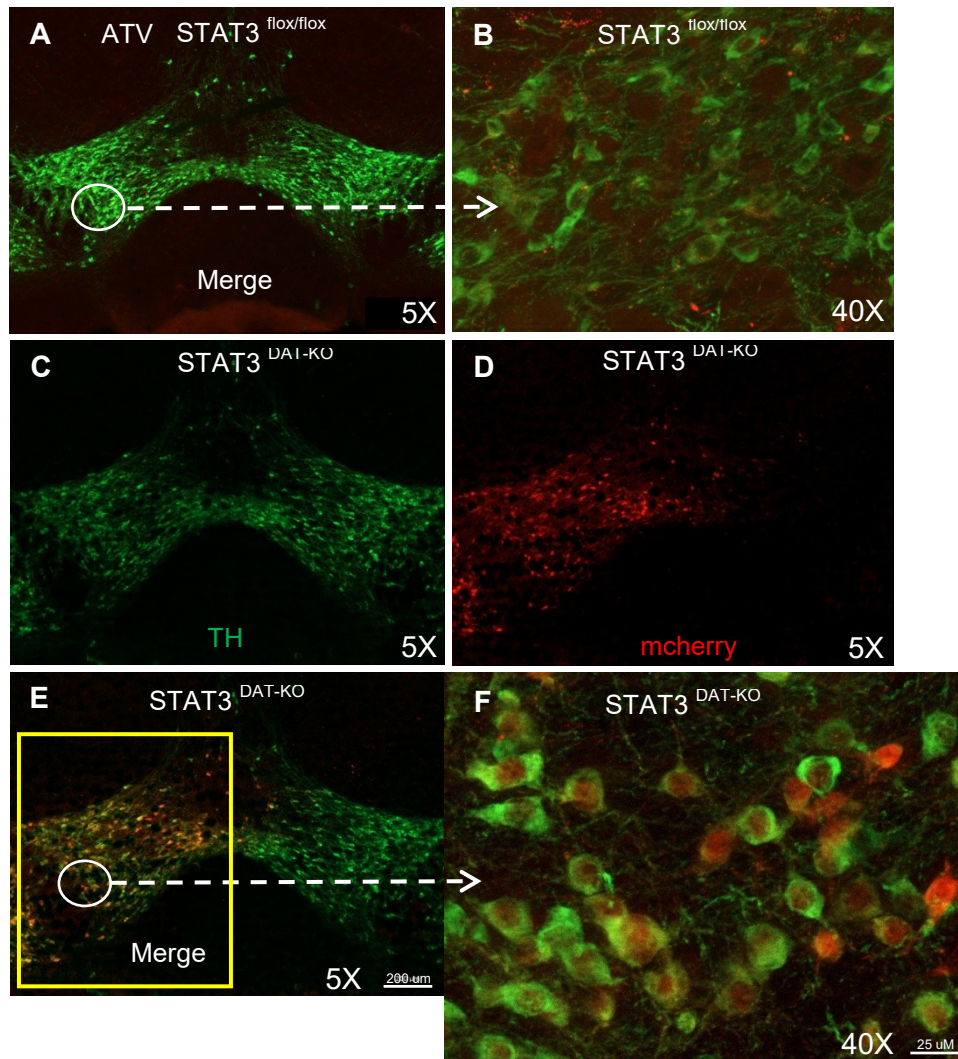
**Figure 6 : Expression relative de l'ARNm des marqueurs des systèmes opioïde et endocannabinoïde.** A-Expression relative dans le VTA et B-le Nac. ABHD6: alpha-beta hydrolase domain 6;  $\beta$ -endo: bêta-endorphine; CB1: cannabinoid receptor-1; DOR: delta opioid receptor; FAAH: fatty acid amide hydrolase; KOR: kappa opioid receptor; MAGL: monoacylglycerol lipase; MOR:mu opioid receptor;PPdyn: pre-prodynorphin; pre-proenkephalin. Moy +/- ESM. \* $p \leq 0.05$  par rapport au contrôle.



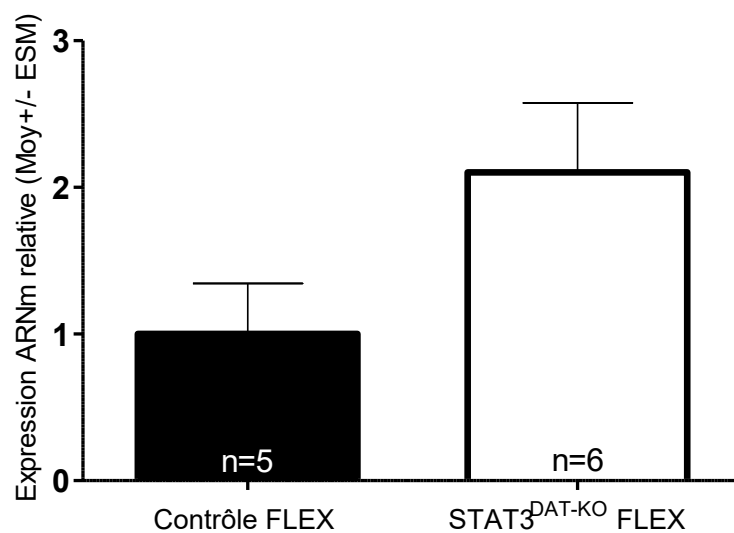
**Figure 7 : Suppression contexte-dépendante de la prise alimentaire.** A- Pourcentage de consommation de boulettes de saccharose le jour du test ou cinquième jour, selon la consommation basale moyenne, évaluée sur trois jours consécutifs. B-Différence entre la quantité de saccharose consommée (g) en basal et le jour du test. Moy +/- ESM.\*\*p≤0,01 et \*\*\*p≤0,001 comparativement à la prise basale respective.



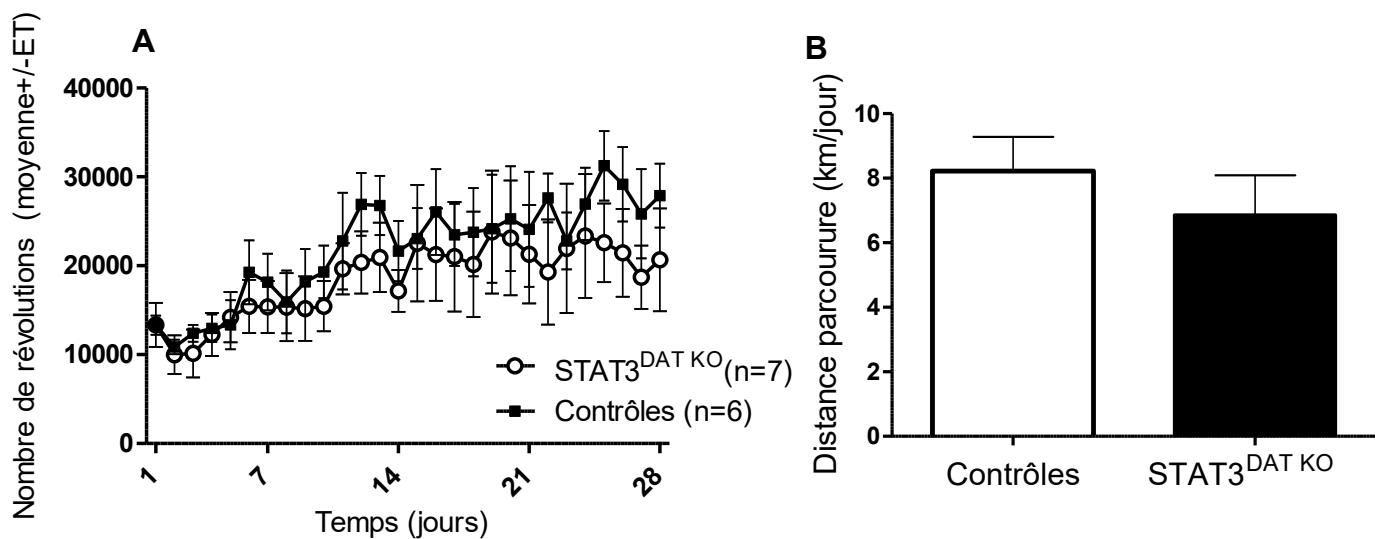
**Figure 8** : Design du vecteur viral et de la stratégie FLEX utilisée pour la réinsertion du gène STAT3 dans les neurones DA.



**Figure 9 :** Coupe coronale de l'ATV et validation immunohistochimique de l'infection virale (AAV9-DIO-STAT3 – 5x10<sup>9</sup>GC/uL, 500 nL par hémisphère) avec stratégie FLEX. A- Aucune recombinaison n'est observée chez le groupe contrôle à 5x B-ni 40x.C - et D - représentent respectivement les cellules dopaminergiques exprimant la TH et la protéine mcherry rouge fluorescente portée par le virus FLEX, et leur colocalisation est illustrée en E- à 5x du côté gauche et F- à 40x. Échelle = 200 um à 5x et 25 um à 40x.



**Figure 10** : Expression relative de STAT3 normalisée à la cyclophiline suite à sa réinsertion dans le code génétique des neurones DA de l'ATV **par** l'injection stéréotaxique de l'AAV-DIO-FLEX. Moy+/-ESM.



**Figure 11 : Utilisation volontaire d'une roue d'exercice suivant la chirurgie FLEX.**

A-Nombre de révolutions des roues d'exercice captées quotidiennement sur une période de 28 et débutant 4 jours suivant la chirurgie FLEX. B-Transposition du nombre de révolutions en distance métrique moyenne parcourue par jour selon le groupe.

Moyenne +/- ESM.



## **Chapitre 4 : Discussion**

La leptine influence de façon importante l'activité locomotrice spontanée de même que l'APV en fonction de la disponibilité des ressources alimentaires. Le rôle de la leptine dans le SR et dans la modulation de la production et du tonus DA est bien documenté, de même que son importance en tant qu'activateur de la cascade de signalisation STAT3. Bien que la distribution centrale de STAT3 soit bien établie, son impact, suite à son activation par la leptine dans les neurones à DA demande à être clarifié. Nous démontrons pour la première fois que STAT3, de par la découverte de son influence sur la libération de DA, est vivement impliqué dans l'effet supprimeur de la leptine sur l'APV ainsi que sur son aspect motivationnel.

### **4.1- Régulation de l'activité locomotrice par la leptine et influence sur les paramètres métaboliques de base**

La leptine est reconnue comme agissant dans l'hypothalamus afin d'influencer l'activité locomotrice, dans un contexte de régulation de l'homéostasie [242]. Au-delà de l'activité spontanée, la leptine influence les propriétés de renforcement de l'APV. La présente étude a dénoté une augmentation de l'activité locomotrice spontanée ainsi que volontaire chez notre modèle STAT3<sup>DAT-KO</sup>. Ce taux d'activité plus élevé explique la différence de poids, reflétée par une masse adipeuse plus faible chez les STAT3<sup>DAT-KO</sup>. La régulation de la prise alimentaire par la leptine n'est par contre pas altérée dans les deux groupes, ce qui peut *a priori* paraître surprenant, la BÉ des STAT3<sup>DAT-KO</sup> étant probablement négative ou décompensée. Il a cependant été rapporté maintes fois chez les humains et les rongeurs que le fait d'être plus actif

physiquement n'était pas associé nécessairement à une compensation équivalente en terme de consommation calorique [47, 53].

Il est possible que le système hypothalamique des orexines/hypocrétines, prenant naissance dans le HL et dont l'activité est opposée à celle de la leptine, soit associé au sentiment d'éveil et d'hyperactivité observé chez les STAT3<sup>DAT-KO</sup> et ce, en concomitance avec la libération de noradrénaline du locus coeruleus [243]. Les niveaux de leptine étant généralement réduits dans un contexte où la masse adipeuse est plus faible, il est possible que les orexines stimulent légèrement la prise alimentaire afin de maintenir une BÉ raisonnablement stable, bien que négative, puisque les STAT3<sup>DAT-KO</sup> mangent généralement moins, la prise alimentaire étant normalisée au poids des souris. Dans un même ordre d'idées, STAT3 est un important modulateur de la prise alimentaire «homéostatique», et cette modulation ne semble pas être dépendante des neurones DA, mais plutôt des neurones AgrRP/NPY et POMC se retrouvant dans l'ARC [244, 245]. Il est donc probable que STAT3 régule à la baisse la prise alimentaire de par son action sur les neurones POMC dans l'ARC. Par contre, il n'est pas impossible que, chez les STAT3<sup>DAT-KO</sup>, la diminution de l'activité anorectique des neurones POMC par la leptine soit légèrement réduite et ce, par une action rétroactive inhibitrice de la protéine SOCS3 sur l'activité leptinergique [246]. Cette réduction hypothétique peut également être causée par une légère diminution de l'expression des récepteurs mélanocortinergiques de type 4 dans l'hypothalamus [247]. Dans une même lignée spéculative que pour l'hypothèse des orexines, cette compensation empêcherait les STAT3<sup>DAT-KO</sup> d'avoir une BÉ trop négative. La prise alimentaire en soi est donc

régulée normalement selon un mécanisme différent de STAT3 dans les neurones DA. Il est important de mentionner à nouveau que la leptine est un promoteur de la locomotion et de l'activité physique lorsque les ressources alimentaires sont abondantes. Ceci dit, au-delà du phénotype hyperactif observé chez notre lignée transgénique, il est possible qu'une réduction de l'activité leptinergique dans les neurones DA engendre une altération à la hausse de sa concentration et de son activité dans d'autres régions du SNC, par exemple l'hypothalamus. À court terme, la leptine agirait en augmentant la dépense énergétique et en maintenant une prise alimentaire constante, les souris étant nourries *ad libitum* [217]. Par contre, à long terme, la diminution de la masse adipeuse des STAT3<sup>DAT-KO</sup> serait associée à une diminution généralisée du taux central de leptine [226]. Cette diminution induirait le développement d'un phénotype hyperactif et serait associée une pratique intensifiée de l'AP [228, 248], et la prise alimentaire serait régularisée par d'autres hormones telles que la ghréline, qui est une hormone orexinergique.

Le RER est un déterminant de la force physique ainsi que de la capacité des muscles à obtenir de l'énergie par oxydation [249]. La leptine promeut l'activité locomotrice lorsque les ressources alimentaires sont abondantes. La leptine n'est pas uniquement un promoteur de la locomotion de part son action sur les neurones DA [184], mais agit également en ce sens sur le système mélanocortinergique tel que mentionné précédemment [250]. Notre modèle ayant un phénotype hyperactif et des caractéristiques physiologiques s'apparentant au TDAH et à l'AN, les résultats concordent avec une étude clinique suggérant que ce type de pathologie n'influence pas le RER même lorsque les individus atteints, traités aux amphétamines ou non,

pratiquent un exercice physique [251]. Une étude menée chez des rongeurs hyperactifs en sont venus aux mêmes conclusions [252]. La DA en soi, de même que notre modèle en général, ne semble donc pas être impliquée [253] dans la variation du RER [249]. STAT3 exerce par contre une grande influence sur le métabolisme du glucose et des lipides de par son activité hypothalamique et pourrait très bien être impliqué dans la régularisation de la consommation d'oxygène et du rejet de dioxyde de carbone dans un contexte d'hyperactivité [254-256]. En ce qui concerne la production de chaleur, les effets de la leptine sur le GLUT seraient importants. Il a été démontré que, chez des souris CKO - invalidées pour le transporteur au GLUT VGLUT-2 spécifiquement sur les neurones contenant le *Leprb* – ces dernières se retrouvent dans un constant état de torpeur qui émergerait du noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus, se résumant par une baisse de température corporelle. Les efférences glutamatergiques projetées vers le NSC médieraient un tempo d'activité [257] dont le rythme serait influencé par la leptine [258]. Il a également été suggéré qu'une communication GABA-glutamatergique entre le SCN et le noyau paraventriculaire (NPV), important dans la régulation des processus autonomiques, influenceraient de façon importante l'impact de la leptine sur la DÉ [257]. Qui plus est, STAT3 ne semble pas être un agent essentiel dans le rôle thermorégulateur de la leptine.[259]. Il serait par contre raisonnable de spéculer que ces paramètres varieraient sans l'ombre d'un doute si les souris avaient accès à une RE dans les études de calorimétrie, où l'effort physique serait volontaire, soutenu et plus apparenté à la pratique d'un exercice physique en soi, plutôt qu'à une simple mesure de l'activité ambulatoire.

L'APV est un phénomène allègrement observé dans les cas de TDAH et l'anorexie basée sur l'activité (ANA) associées à l'hyperactivité ainsi qu'à une activité leptinergique diminuée [219], et cet état est renversé par l'injection systémique par mini-pompe osmotique de leptine chez un modèle hyperactif de rat [219]. Ceci pourrait expliquer, en partie, l'activité locomotrice spontanée et volontaire augmentées chez notre modèle  $STAT3^{DAT-KO}$ . L'ANA est associée à une diminution de la consommation calorique et une augmentation de l'AP, surtout précédant la prise calorique, ceci en concordance avec un phénotype hyperactif. Ces observations ont été associées avec un comportement d'anticipation envers la consommation ou la trouvaille de nourriture, et ce même comportement hyperactif a été rapporté comme récompensant par les individus atteints d'ANA. Scheurink a ensuite émis l'hypothèse explicative qu'être actif et manger moins est effectivement récompensant, et active le système mésolimbique dopaminergique et opioïdérique en plus des systèmes associés au sentiment d'éveil [260]. A un certain point, un désir ardent d'être actif s'installe afin de camoufler l'effet d'abstinence, tel qu'observé dans les modèles de dépendance. Les individus ANA seraient même plus vulnérables aux effets addictifs des drogues psychostimulantes [260, 261]. Cette hypothèse abonde dans le même sens que le résultat obtenu dans la PPC (Article : Figures 3-A-C), où les  $STAT3^{DAT-KO}$  démontrent une préférence augmentée pour le côté de l'appareil pairé avec l'utilisation précédente d'une roue RE fonctionnelle. Bien qu'il s'agisse d'un enrichissement environnemental pour les rongeurs en général, cette préférence était nettement plus élevée chez les  $STAT3^{DAT-KO}$  et non renversé par l'injection intra-ATV de leptine (Articles : Figures 3-D, E).

La leptine régule l'activité locomotrice spontanée et associée à l'anticipation d'atteindre des ressources alimentaires de façon indépendante. En effet, il a été rapporté que l'injection systémique de leptine chez la souris augmente l'activité locomotrice générale mais diminue le comportement de recherche anticipée de nourriture [262]. Il est donc possible que, dans le cas de notre modèle, le phénotype hyperactif observé soit associé à l'incapacité de la leptine de supprimer cet effet anticipateur, qui serait médié par une modulation du tonus dopaminergique par STAT3 indépendamment de la présence ou de l'absence de ces ressources.

#### **4.2- Régulation de la neurotransmission dopaminergique par STAT3 et modulation du système des opioïdes**

La DA est un neurotransmetteur essentiel agissant sur les propriétés de renforcement des stimuli récompensants, ainsi que sur les processus décisionnels et les fonctions exécutives [263, 264]. La présence ou l'anticipation d'une récompense produit une libération phasique de DA des neurones DA de l'ATV, projetant une partie de ses efférences vers le Nac, augmentant la volonté de se procurer cette récompense [85]. La leptine augmente la libération de DA dans un modèle de souris ob/ob, et cette libération est associée à une augmentation de l'activité locomotrice [184]. Par contre, la leptine, dans le contexte de récompense, module à la baisse la production et libération de DA, diminuant la volonté de se la procurer, et est reconnue comme diminuant le seuil de sensibilité de la récompense dans des études d'ASIC [213]. *A priori*, il serait raisonnable de statuer qu'une libération diminuée de DA dans le Nac, dans un contexte où l'activité de la leptine est réduite et où l'aspect

récompensant du stimulus étudié – ici l'activité locomotrice volontaire – est augmentée est contre-intuitif [184]. Ce phénotype concorde cependant avec ce qui est observé chez les modèles de souris HVR. Comme mentionné, les niveaux de DA extracellulaire sont réduits chez les individus hyperactifs, par exemple dans les cas de TDAH, où l'aspect renforçant de l'exercice est plus élevé. Chez les modèles animaux HVR, il est question de 4 choses 1) les modèles de souris reproduits pour ces capacités sont la plupart du temps considérés comme des modèles génétiques d'hyperactivité ou d'ANA [265] 2) les individus hyperactifs ont une plus grande propension à entrevoir l'exercice comme une récompense naturelle [265], 3) les taux plasmatiques de leptine corrélaient négativement avec l'intensité d'utilisation de la RE [228] et 4) d'après Rhodes, les modèles HVR sont uniques de par leur motivation élevée envers la course et non par leur capacité d'endurance [266]. Ces caractéristiques peuvent être associées à une hyperactivité causée par une hypodopaminergie. Ceci dit, chez ces modèles HVR, l'administration de bloqueurs du DAT [265] ou d'apomorphine – un agoniste dopaminergique non-sélectif - [267] renversent temporairement leur phénotype hyperactif. Cette réduction de l'activité locomotrice s'apparente à ce que nous observons chez notre modèle transgénique, suite à l'injection de deux psychostimulants, l'amphétamine et le SKF-82958. Chez l'humain, les médicaments à base d'amphétamines (Adderall) et de pipéridines (Ritalin) sont d'ailleurs prescrits aux individus atteints de TDAH afin d'augmenter leur niveau de concentration et diminuer leur tempérament hyperactif [268].

Dans un autre ordre d'idée, les cas d'obésité chronique induite par la diète sont associés à une diminution des récepteurs D2 [238] et D1 [269], de même que

dans les cas chroniques de dépendance aux drogues, plus particulièrement la cocaïne [270, 271]. Ces effets sont probablement dus à une désensibilisation des récepteurs provoquant un effet de tolérance et menant potentiellement à un comportement de consommation compulsive. Dans un autre ordre d'idées, il n'est pas impossible qu'à long terme, la libération phasique augmentée de DA observée lorsque l'effet récompensant d'un stimulus est plus grand qu'anticipé mène à une telle désensibilisation, ou encore qu'à long terme, cette erreur de prédiction s'atténue en concomitance avec la production et libération de DA et pourrait être en partie reliée à l'intervention de l'habénula latérale, activant les neurones GABAergiques du tegmentum rostromédian, qui lui diminue la libération de DA des neurones de l'ATV [272]. La récompense finit par être normale/tolérée ou plus petite que souhaité [272]. Il est à noter que les neurones DA ne sont pas les seuls à être impliqués dans la motivation à poursuivre un but [273]. En effet, l'activation neuronale dans le cortex orbitofrontal ainsi que dans le striatum rendent également compte d'une excitabilité plus élevée dans différents contextes associés à l'atteinte d'une récompense [273]. Bien que l'activation des neurones DA ne soit pas restreinte à l'atteinte d'une récompense inattendue, les neurones du striatum, ou essentiellement les NMEs, sont davantage activés lorsque l'atteinte d'un but est plus prédictible et garant de la mise en œuvre d'un plan moteur déterminé [273]. Les neurones du cortex orbitofrontal sont plutôt impliqués dans l'évaluation de l'effort à fournir envers l'atteinte d'une récompense donnée et répondent à des stimuli odorants et visuels [273, 274]. Il est légitime de supposer qu'après un certain temps, l'effet «surprise» associé au sentiment de bien-être ressenti lors de l'utilisation d'une RE chez les animaux ou de



la pratique d'un sport d'endurance chez l'homme se dissipe, laissant place à une production et libération de DA diminuée dans le Nac. Ceci pour faire place à l'activation de régions reliées à une meilleure prédictibilité de l'atteinte d'une récompense donnée. Nous devons cependant valider notre modèle à ce niveau, puisqu'il pourrait courir compulsivement du fait de son phénotype hyperactif basal. Par ailleurs, si l'on se fie aux résultats exposés dans l'article, l'activité volontaire n'est pas exponentielle mais est relativement constante chez nos deux groupes sans regard sur la distance parcourue. Il serait par contre intéressant d'observer la présence des récepteurs dopaminergiques suite à un accès prolongé aux roues d'exercice chez notre modèle invalidé, afin de vérifier s'il est possible de décrire notre modèle animal comme un modèle de dépendance à l'AP à proprement dit [271].

La leptine exerce une influence sur le système des opioïdes. Il serait alors tout à fait possible que ce dernier soit altéré car 1) l'activité leptine-dépendante dans les neurones DA est plus basse et exerce normalement une influence sur ces systèmes [275, 276] et/ou 2) l'activité opioïdergique compense pour une activité dopaminergique mésolimbique réduite chez les  $STAT3^{DAT\ KO}$  en modulant leurs fonctions. En effet, nous observons une diminution de l'expression du précurseur de la DYN dans le VTA ainsi qu'une tendance vers une augmentation de l'expression du DOR dans le Nac. La DYN est impliquée dans le parcours direct de la locomotion et est sécrétée, entre autre, par les NMEs situés dans le Nac. L'expression plus faible de DYN dans l'ATV n'explique cependant pas la diminution de DA produite et libérée observée, étant donné qu'elle est typiquement impliquée dans la diminution de sa libération, agissant comme renforçateur négatif [123]. La DYN est également

associée à un état dépressif, contrairement à l'ENK ou à la  $\beta$ -END. Par contre, une étude récente a démontré un rôle dichotomique de la DYN provenant de sous-populations distinctes de neurones dans le Nac, où l'activité dans la coquille serait plus aversive, contrairement au cœur du Nac [119]. Il est également à noter que les individus hyperactifs ou ANA possèdent un système opioïde endogène qui leur est propre ainsi que de bas niveaux de leptine, en plus de niveaux réduits de DA [277]. Comme dans les modèles animaux transgéniques, l'hypodopaminergie observée chez ces individus serait associée à un déficit du SR, expliquant leur motivation à combler un manque de satisfaction à travers la consommation d'une récompense naturelle [278]. Il a également été rapporté que le taux de DYN est augmenté dans le striatum dorsal suite à la consommation de cocaïne et l'utilisation d'une RE chez le rat Lewis– concordant avec l'activation du parcours direct de la locomotion [170], suggérant que la DA et la DYN s'inter-régulent de manière proportionnelle [279]. La diminution de la production et libération de DA dans le Nac pourrait donc être à l'origine de l'expression réduite de DYN dans l'ATV.

Il n'est pas impossible que l'hypocrétine soit impliquée, vu ses effets parfois opposés à la DYN [118, 280]. L'hypocrétine diminue l'effet aversif de la DYN plutôt que d'augmenter l'aspect récompensant des stimuli à proprement dit, et promeut davantage le sentiment d'éveil associé aux processus motivationnels. La DYN se situe également, tout comme l'hypocrétine, dans les vésicules synaptiques glutamatergiques de l'HL [281, 282]. L'hypocrétine, en, plus de la DYN, est également un important régulateur du stress par la relâche de corticotropine, et exercent un effet inverse à celui de la leptine dans l'HL en agissant sur les neurones

GABAergiques [283]. Il est possible que l'activation de ces neurones augmente indirectement la libération tonique et phasique de DA dans des conditions de stress, un phénomène potentiellement réduit lorsque l'activité leptinergique est déficiente [284]. L'une des caractéristiques phénotypes des modèles animaux HVR est par ailleurs un taux plasmatique de corticostérone plus élevé [228]. À cet effet, il n'est pas impossible que les STAT3<sup>DAT KO</sup> éprouvent un plus haut niveau de stress associé avec la baisse de libération et production de DA, dans un contexte où la signalisation leptinergique dans les neurones DA est déficiente.

L'invalidation embryonnaire pour STAT3 dans les neurones DA (voir section 2.1 des Méthodes) de notre modèle animal en lien avec une activité volontaire augmentée observée chez les STAT3<sup>DAT KO</sup> pourrait relever d'une intervention trophique adaptée de la leptine sur l'activité dopaminergique, ou d'adaptations du système dopaminergique en lui-même. En ce sens, il est intéressant de constater la réversibilité de notre modèle, démontrant que le phénotype exposé ne découle pas d'actions trophiques de la leptine sur le système dopaminergique. Il est intéressant que les souris invalidées dont le gène a été réinséré dans les neurones DA démontrent une tendance à courir un peu moins que les contrôles. Cela peut s'expliquer par le volume d'injection de l'adénovirus utilisé, qui était de 500 nL par hémisphère. L'infection s'étendant bien au-delà de l'ATV et très probablement dans la SN, une région dont l'implication dans le contrôle locomoteur est cruciale, et où un déficit en DA est associé aux symptômes d'hyperactivité précédant la maladie de Parkinson [285]. Qui plus est, le Leprb est exprimé sur les neurones DA de la SN et est également impliqué dans la recherche de stimuli récompensants [196].

#### **4.3- Effets anorectants de la leptine dans les neurones DA et impact sur la recherche compulsive de nourriture**

Il est légitime de supposer que les souris  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$  sont compulsives, et courent dans le but d'atteindre un gain alimentaire. De plus, ces dernières, en plus du groupe contrôle, semblaient présenter un déficit d'apprentissage, probablement dû au background génétique. En effet, dans une tâche de conditionnement opérant, les deux groupes de souris devaient effectuer une association entre la presse d'un levier et la délivrance d'une boulette de saccharose, tout en discriminant la fonctionnalité du levier, l'un étant actif et l'autre, inactif (article, figures 2-C, D). Une performance particulièrement aléatoire a été observée chez les deux groupes et plus particulièrement chez les souris  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$ . On peut émettre une hypothèse, en ce sens qu'une libération diminuée de DA pourrait être associée à un déficit au niveau de la flexibilité cognitive. Il a également été démontré, chez les modèles HVR, que le fait de courir en forte intensité menait à une plus grande perte neuronale dans la région CA2/3 de l'hippocampe – dont le rôle dans les processus d'apprentissage est bien connu - et ce, subséquemment à l'induction d'une lésion hippocampale à l'acide kaïnique, un acide aminé qui, en activant les récepteurs kaïnate glutamatergiques, exercent une activité excitotoxique élevée [286]. Cette observation est curieuse, puisqu'*a priori*, l'exercice physique est associé à la neurogenèse ainsi qu'à de plus hauts taux de *Brain Derived Neurotrophic Factor* dans l'hippocampe, chez ces modèles. Ce paradoxe soutient cependant que l'exercice physique, normalement associé à la neurogenèse hippocampale est, dans ce contexte d'hyperactivité et de dépense énergétique excessive, associé à l'endommagement neuronale par

l'entremise d'un potentiel excitotoxique plus élevé, dû à une sur sollicitation de l'hippocampe [286].

La leptine diminue la prise alimentaire ainsi que les propriétés récompensantes de la nourriture [201], mais également d'autres types de stimuli tels que les drogues d'abus [202] et l'AP [218]. La délétion de STAT3 augmente significativement l'activité volontaire et mime le phénotype de modèles animaux HVR. La leptine agirait normalement en inhibant le comportement de recherche de nourriture en réduisant l'APV [218]. La leptine régule la prise alimentaire selon différents mécanismes, indépendamment de STAT3 dans les neurones à DA, du moins agit sur une sous-population différente de neurones [205]. Comme mentionné dans l'introduction, il n'est pas impossible que la régulation de la prise alimentaire soit davantage menée par la signalisation ERK ½ plutôt que STAT3 dans ce contexte [207]. Qui plus est, il a été démontré qu'une inhibition de la signalisation dopaminergique dans le Nac ne réduisait pas la prise alimentaire, dans un contexte où l'accès à la nourriture est libre ou requiert un effort léger pour son obtention [287, 288], expliquant par ailleurs le résultat obtenu pour le test du dessert (Article : Figure 2-F). Ceci propose une avenue crédible par rapport à l'influence de STAT3 dans les processus reliés à l'effort à fournir vers l'atteinte d'un but à travers la modulation du système dopaminergique, le but présent étant le sentiment de récompense associé à l'activité physique. La recherche indirecte de ressources alimentaires n'est pas un phénomène ou une hypothèse à oublier cependant, mais cette recherche indirecte serait, de façon spéculative, associée à une DÉ d'envergure, augmentant alors la valeur du gain [37].

## **Chapitre 5 : Conclusions et perspectives**

Nous démontrons pour la première fois que le phénomène du *runner's high* implique une régulation du tonus dopaminergique par STAT3 et la leptine dans le système mésolimbique. Notre modèle mime le phénotype des individus atteints du TDAH, mais mime également certains aspects observés dans les cas chroniques de dépendance à la nourriture palatable ou aux drogues d'abus.

Il serait pertinent de caractériser davantage le modèle STAT3<sup>DAT KO</sup> en regard de son potentiel «génétiquement» addictif. En effet, les modèles HVR sont définis comme étant dépendants aux effets que procure l'utilisation compulsive d'une RE [265]. Différentes approches expérimentales peuvent être utilisées. Par exemple, nous pourrions vérifier la présence de symptômes de sevrage suite au retrait de l'accès chronique à une RE, puis vérifier le nombre de révolutions sur une certaine période donnée suivant un retrait à court-terme ou à long-terme de l'accès. Les individus atteints de TDAH ou d'ANA sont plus à risque de développer des problèmes de dépendance à des substances autres que l'AP [289, 290]. Dans cette optique, il serait intéressant d'exposer notre modèle à une drogue, par exemple l'amphétamine, la cocaïne ou encore de la nourriture palatable suite à un sevrage de la RE. Les souris pourraient peut-être compenser un manque de bien-être, associé aux symptômes de sevrage et donc à un déficit du SR par la prise compulsive de ces substances. Au final, il serait intéressant, après cette nouvelle exposition, de procéder à une tâche préférentielle, où les souris auraient le choix entre courir dans une RE ou consommer une certaine quantité de drogue ou de nourriture palatable,

afin de vérifier comment ce modèle se comporterait face à une récompense naturelle et synthétique, dont l'exposition est associée à des contextes différents. Dans sa revue, Sherwin en vient à la conclusion – servant à valider la pertinence des expérimentations proposées - que l'utilisation de la RE par les rongeurs n'est pas associé à la poursuite d'un but «matériel» [59]. Dans cette même lignée de pensée, il serait intéressant de parfaire notre compréhension de l'interaction siégeant entre le système des opioïdes et dopaminergique en regard de l'influence contextuelle de la leptine. Le taux de leptine est proportionnel aux effets analgésiques de la morphine et associé à une libération augmentée de DA chez le rat [59] et le *Lepr<sup>b</sup>* serait potentiellement exprimé sur les neurones GABA du mésencéphale [196] et non uniquement sur les neurones POMC. Une expérience simple et efficace serait d'injecter aux souris de la naloxone quelques minutes avant le début de leur phase d'activité et vérifier le nombre de km parcourus sur une période donnée, et valider cette même hypothèse en y ajoutant une injection préalable ip de leptine.

Nous avons démontré que la réinsertion de STAT3 dans les neurones du mésencéphale renverse le phénotype hyperactif initial des *STAT3<sup>DAT-KO</sup>*, normalisant l'APV à celle des contrôles. Par contre, dû à des contraintes de temps, nous n'avons pas été en mesure de procéder à une caractérisation approfondie de ce nouveau modèle, principalement en ce qui concerne la performance de PPC, l'injection de psychostimulants, la mesure voltamétrique de la relâche de DA, la vérification de l'expression des marqueurs du système des opioïdes et la prise compulsive de nourriture.

Carrier soutient que les animaux, incluant l'homme, se livrent à une pratique intensifiée de l'AP lorsque les ressources alimentaires sont restreintes, augmentant donc la valeur du gain alimentaire encouru [37]. Scheurink a ensuite émis l'hypothèse que le comportement observé chez les individus hyperactifs et ANA, qui courent beaucoup tout en mangeant moins, est relié à la poursuite d'un but, d'un bien-être psychophysique [260]. Il peut paraître hors norme de mettre en contexte deux idéologies complètement différentes, l'une partant d'un phénomène biologique, naturel voire essentiel, et l'autre associée à un contexte pathologique. Par contre, ces deux contextes ont deux points en commun, soit une DÉ élevée en réponse à une (auto)privation d'accès à des ressources alimentaires, et cette situation est associée à de bas niveaux plasmatiques de leptine. Cette observation met en lumière une idéologie évolutive plus commune de recherche indirecte de nourriture par la pratique intense d'un exercice physique, corrélant avec une réduction de l'activité de l'hormone de satiété. D'un point de vue expérimental, il serait intrigant de vérifier l'hypothèse de poursuite indirecte de nourriture en utilisant le principe de conditionnement opérant, mais en remplaçant la presse d'un levier par la délivrance de boulettes de saccharose conditionnellement à l'utilisation d'une RE dont la durée et la vitesse serait constante ou exponentielle.

En dernier lieu, les processus d'apprentissages chez les modèles HVR sont altérés. Il serait souhaitable de valider notre modèle en ce sens, la performance à la tâche de conditionnement opérant étant déficiente. Une façon simple de répondre à cette question serait de mesurer l'expression du BDNF dans l'hippocampe, de même que les marqueurs de l'apoptose, par exemple le caspase-3. La vérification de



nécrose au moyen de coupes histologiques de l'hippocampe serait également une idée à considérer. Ainsi, une augmentation de ces marqueurs corrèlerait parfaitement avec l'hypothèse proposée par Rhodes quant à l'altération des processus d'apprentissage dû à une motivation obsessionnelle envers le fait d'être actif [265].

Cette découverte est une clé vers une meilleure compréhension de l'implication des hormones de l'appétit sur l'aspect récompensant et évolutif des paramètres causaux de l'APV et peut faire l'objet d'un usage éducatif intéressant. La promotion d'un mode de vie sain par la pratique de l'exercice physique chez les individus obèses, ces derniers étant hyperleptinémiques, engendrerait une diminution progressive des taux centraux et plasmatiques de leptine par une diminution de la masse grasse. Cette diminution pourrait amener ces individus à transposer leur dépendance envers la consommation de nourriture palatable vers une mentalité où l'activation du système de récompense les dirigerait vers une autopromotion de la santé, entre autre par une augmentation progressive de l'estime personnelle. De plus, la validation de notre modèle en tant que modèle HVR mimant le phénotype de du TDAH et de l'ANA, rendrait plus précisément compte de l'influence des hormones de l'appétit sur la modulation du tonus dopaminergique dans un contexte de dépendance à l'AP. Il ferait l'objet d'une nouvelle ligne tangentielle vers une meilleure compréhension, la mise au point de meilleurs outils diagnostiques et, pourquoi pas, le développement de nouveaux traitements en lien avec ces pathologies.

## **Références**

1. Hallal PC, Andersen LB, Bull FC, Guthold R, Haskell W, Ekelund U. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet* (London, England). 2012 Jul 21;380(9838):247-57. PubMed PMID: 22818937. eng.
2. Organization WH. Exercice physique 2016 [updated 2016; cited 2016]. Available from: [http://www.who.int/topics/physical\\_activity/fr/](http://www.who.int/topics/physical_activity/fr/).
3. Tipton CM. Susruta of India, an unrecognized contributor to the history of exercise physiology. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2008 Jun;104(6):1553-6. PubMed PMID: 18356481. Epub 2008/03/22. eng.
4. Messerli FH, Messerli AW, Luscher TF. Eisenhower's billion-dollar heart attack-50 years later. *The New England journal of medicine*. 2005 Sep 22;353(12):1205-7. PubMed PMID: 16177247. Epub 2005/09/24. eng.
5. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*. 2012 Apr;2(2):1143-211. PubMed PMID: 23798298. Pubmed Central PMCID: PMC4241367. Epub 2012/04/01. eng.
6. Brené S, Bjørnebekk A, Åberg E, Mathé AA, Olson L, Werme M. Running is rewarding and antidepressive. *Physiology & behavior*. 2007 05/21;92(1-2):136-40. PubMed PMID: PMC2040025.
7. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 February 15, 2011;108(7):3017-22.
8. Hillman CH, Pontifex MB, Castelli DM, Khan NA, Raine LB, Scudder MR, et al. Effects of the FITKids randomized controlled trial on executive control and brain function. *Pediatrics*. 2014 Oct;134(4):e1063-71. PubMed PMID: 25266425. Pubmed Central PMCID: PMC4179093. Epub 2014/10/01. eng.
9. Whiteman AS, Young DE, Budson AE, Stern CE, Schon K. Entorhinal volume, aerobic fitness, and recognition memory in healthy young adults: A voxel-based morphometry study. *NeuroImage*. 2015 Nov 26;126:229-38. PubMed PMID: 26631814. Epub 2015/12/04. Eng.
10. Chapman SB, Aslan S, Spence JS, Defina LF, Keebler MW, Didehbani N, et al. Shorter term aerobic exercise improves brain, cognition, and cardiovascular fitness in aging. *Frontiers in aging neuroscience*. 2013;5:75. PubMed PMID: 24282403. Pubmed Central PMCID: PMC3825180. Epub 2013/11/28. eng.
11. Nevill AM, Duncan MJ, Lahart I, Sandercock G. Modelling the association between weight status and social deprivation in English school children: Can physical activity and fitness affect the relationship? *Annals of human biology*. 2015 Dec 1:1-8. PubMed PMID: 26515632. Epub 2015/10/31. Eng.
12. Minasian V, Marandi SM, Kelishadi R, Abolhassani H. Correlation between Aerobic Fitness and Body Composition in Middle School Students. *International journal of preventive medicine*. 2014 Dec;5(Suppl 2):S102-7. PubMed PMID: 26157558. Pubmed Central PMCID: PMC4476005. Epub 2015/07/15. eng.
13. Kramer AF, Hahn S, Gopher D. Task coordination and aging: explorations of executive control processes in the task switching paradigm. *Acta psychologica*. 1999 Apr;101(2-3):339-78. PubMed PMID: 10344190. Epub 1999/05/27. eng.

14. Heijnen S, Hommel B, Kibele A, Colzato LS. Neuromodulation of Aerobic Exercise—A Review. *Frontiers in Psychology*. 2016 2016-January-7;6. English.
15. Gouarne C, Groussard C, Gratas-Delamarche A, Delamarche P, Duclos M. Overnight urinary cortisol and cortisone add new insights into adaptation to training. *Medicine and science in sports and exercise*. 2005 Jul;37(7):1157-67. PubMed PMID: 16015133. Epub 2005/07/15. eng.
16. Whitworth JA, Williamson PM, Mangos G, Kelly JJ. Cardiovascular Consequences of Cortisol Excess. *Vascular Health and Risk Management*. 2005 12;1(4):291-9. PubMed PMID: PMC1993964.
17. Ehler U, Gaab J, Heinrichs M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biological psychology*. 2001 Jul-Aug;57(1-3):141-52. PubMed PMID: 11454437. Epub 2001/07/17. eng.
18. Wust S, Federenko I, Hellhammer DH, Kirschbaum C. Genetic factors, perceived chronic stress, and the free cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology*. 2000 Oct;25(7):707-20. PubMed PMID: 10938450. Epub 2000/08/12. eng.
19. Wust S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C. The cortisol awakening response - normal values and confounds. *Noise & health*. 2000;2(7):79-88. PubMed PMID: 12689474. Epub 2003/04/12. Eng.
20. Kreher JB, Schwartz JB. Overtraining Syndrome: A Practical Guide. *Sports Health*. 2012;4(2):128-38. PubMed PMID: PMC3435910.
21. Meeusen R, Duclos M, Gleeson M, Rietjens G, Steinacker J, Urhausen A. Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome. *European Journal of Sport Science*. 2006 2006/03/01;6(1):1-14.
22. Camiletti-Moiron D, Aparicio VA, Aranda P, Radak Z. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2013 Aug;23(4):e202-12. PubMed PMID: 23495801. Epub 2013/03/19. eng.
23. Aguiar AS, Jr., Boemer G, Rial D, Cordova FM, Mancini G, Walz R, et al. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience*. 2010 Dec 29;171(4):1216-27. PubMed PMID: 20888397. Epub 2010/10/05. eng.
24. McCloskey DP, Adamo DS, Anderson BJ. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain research*. 2001 Feb 9;891(1-2):168-75. PubMed PMID: 11164820. Epub 2001/02/13. eng.
25. Stewart CC. Variations in daily activity produced by alcohol and by changes in barometric pressure and diet with a description of recording methods. *Am J Physiol*. 1898;1:17.
26. Shenk F. Analys en actographe et dans sa cage, de la réponse comportementale du mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) à un jeûne de 24H. *Journal de Physiologie*. 1975;70:13.
27. Mather JG. Wheel-running activity: a new interpretation. *Mammal Review*. 1981;11(1):41-51.
28. de Kock LL, Rohn I. Observations on the use of the exercise-wheel in relation to the social rank and hormonal conditions in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*),

- and the Norway lemming (*Lemmus lemmus*). *Zeitschrift fur Tierpsychologie*. 1971 Sep;29(2):180-95. PubMed PMID: 5166538. Epub 1971/09/01. eng.
29. Baker RR. The Evolutionary Ecology of Animal Migration. Staughton H, editor. London 1978.
  30. Sheppe W. Exploration by the deer mouse, *Peromyscus Leucopus*. *Am Midland Naturalist*. 1966;76:257-76.
  31. Baumeister A, Hawkins WF, Cromwell RL. NEED STATES AND ACTIVITY LEVEL. *Psychological bulletin*. 1964 Jun;61:438-53. PubMed PMID: 14183607. Epub 1964/06/01. eng.
  32. Price EO. Effect of Food Deprivation on Activity of the Least Weasel. *Journal of Mammalogy*. 1971;52(3):636-40.
  33. Watts CHS. The foods eaten by wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) in Wytham Woods, Berkshire. *J of Animal Ecology*. 1968;37:25-41.
  34. Grodzinski W. Influence of food upon diurnal activity of small rodents. *Proceedings of the International Symposium on Methods of Mammalian Investigations*. 1962:134-40.
  35. Wald G, Jackson B. Activity and Nutritional Deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1944;30(9):255-63. PubMed PMID: PMC1078707.
  36. Haddad NF, Szalda-Petree A, Karkowski A, Foss RL, Berger LH. Wheel-running in discrete trial and operant paradigms under various effort requirements. *Physiology & behavior*. 1994 Sep;56(3):487-93. PubMed PMID: 7972398. Epub 1994/09/01. eng.
  37. Carrier DR, Kapoor AK, Kimura T, Nickels MK, Satwanti, Scott EC, et al. The Energetic Paradox of Human Running and Hominid Evolution [and Comments and Reply]. *Current Anthropology*. 1984;25(4):483-95.
  38. Wolpoff MH. Some aspects of the evolution of early hominid sexual dimorphism. *Current Anthropology*. 1976;17:8.
  39. Bramble DM, Lieberman DE. Endurance running and the evolution of Homo. *Nature*. 2004 11/18/print;432(7015):345-52.
  40. Fernandes MF, Matthys, D., Hryohrczuk, C., Sharma, S., Shabana, M., Alquier, T., Fulton S. Leptin suppresses the rewarding effects of running via Stat3 signaling in dopamine neurons. *Cell Metab*. 2015;22:1-9. Epub September 3.
  41. Watanabe H. Running, Creeping and Climbing: A New Ecological and Evolutionary Perspective on Human Locomotion. *Mankind*. 1971;8(1):1-13.
  42. Bartness TJ, Keen-Rhinehart E, Dailey MJ, Teubner BJ. Neural and hormonal control of food hoarding. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011 Sep;301(3):R641-55. PubMed PMID: 21653877. Pubmed Central PMCID: PMC3290004. Epub 2011/06/10. eng.
  43. Overton JM, Williams TD. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiology & behavior*. 2004 Jul;81(5):749-54. PubMed PMID: 15234180. Epub 2004/07/06. eng.
  44. Morrison SD. Regulation of water intake by rats deprived of food. *Physiology & behavior*. 1968 1968/01/01;3(1):75-81.

45. Routtenberg A, Kuznesof AW. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol.* 1967 Dec;64(3):414-21. PubMed PMID: 6082873. Epub 1967/12/01. eng.
46. Thivel D, Metz L, Julien A, Morio B, Duche P. Obese but not lean adolescents spontaneously decrease energy intake after intensive exercise. *Physiology & behavior.* 2014 Jan 17;123:41-6. PubMed PMID: 24103421. Epub 2013/10/10. eng.
47. Blundell JE, Stubbs RJ, Hughes DA, Whybrow S, King NA. Cross talk between physical activity and appetite control: does physical activity stimulate appetite? *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2003 Aug;62(3):651-61. PubMed PMID: 14692601. Epub 2003/12/25. eng.
48. Martins C, Robertson MD, Morgan LM. Effects of exercise and restrained eating behaviour on appetite control. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2008 Feb;67(1):28-41. PubMed PMID: 18234129. Epub 2008/02/01. eng.
49. Fearnbach SN, Silvert L, Keller KL, Genin PM, Morio B, Pereira B, et al. Reduced neural response to food cues following exercise is accompanied by decreased energy intake in obese adolescents. *International journal of obesity (2005).* 2016 Jan;40(1):77-83. PubMed PMID: 26449418. Epub 2015/10/10. eng.
50. Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Segal K, Meltzer S, Foelsch PA. Acute effects of exercise on food intake in obese and nonobese women. *The American journal of clinical nutrition.* 1990 Aug;52(2):240-5. PubMed PMID: 2375289. Epub 1990/08/01. eng.
51. Woo R, Garrow JS, Pi-Sunyer FX. Voluntary food intake during prolonged exercise in obese women. *The American journal of clinical nutrition.* 1982 Sep;36(3):478-84. PubMed PMID: 7113953. Epub 1982/09/01. eng.
52. Douglas JA, King JA, McFarlane E, Baker L, Bradley C, Crouch N, et al. Appetite, appetite hormone and energy intake responses to two consecutive days of aerobic exercise in healthy young men. *Appetite.* 2015 Sep;92:57-65. PubMed PMID: 25963104. Epub 2015/05/13. eng.
53. Blundell JE, King NA. Physical activity and regulation of food intake: current evidence. *Medicine and science in sports and exercise.* 1999 Nov;31(11 Suppl):S573-83. PubMed PMID: 10593531. Epub 1999/12/11. eng.
54. Whybrow S, Hughes DA, Ritz P, Johnstone AM, Horgan GW, King N, et al. The effect of an incremental increase in exercise on appetite, eating behaviour and energy balance in lean men and women feeding ad libitum. *The British journal of nutrition.* 2008 Nov;100(5):1109-15. PubMed PMID: 18377694. Epub 2008/04/02. eng.
55. Dulloo AG, Jacquet J, Girardier L. Poststarvation hyperphagia and body fat overshooting in humans: a role for feedback signals from lean and fat tissues. *The American journal of clinical nutrition.* 1997 Mar;65(3):717-23. PubMed PMID: 9062520. Epub 1997/03/01. eng.
56. Hurren BJ, Flack NA. Prader-willi syndrome: A spectrum of anatomical and clinical features. *Clinical anatomy (New York, NY).* 2016 Jan 7. PubMed PMID: 26749552. Epub 2016/01/11. Eng.
57. Lundgren JD, Shapiro JR, Bulik CM. Night eating patterns of patients with bulimia nervosa: a preliminary report. *Eating and weight disorders : EWD.* 2008 Dec;13(4):171-5. PubMed PMID: 19169072. Epub 2009/01/27. eng.

58. Bolles RC. Theory of Motivation. 2nd Edition ed. Row Ha, editor. New York 1975.
59. Sherwin CM. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav.* 1998 Jul;56(1):11-27. PubMed PMID: 9710457. Epub 1998/12/16. Eng.
60. Possidente B, Stephan FK. Circadian period in mice: Analysis of genetic and maternal contributions to inbred strain differences. *Behavior Genetics.* 18(1):109-17.
61. Yamada N, Shimoda K, Takahashi K, Takahashi S. Change in period of free-running rhythms determined by two different tools in blinded rats. *Physiology & behavior.* 1986;36(2):357-62. PubMed PMID: 3961013. Epub 1986/01/01. eng.
62. Calhoun JB. Diel Activity Rhythms of the Rodents, *Microtus Ochrogaster* and *Sigmodon Hispidus Hispidus*. *Ecology.* 1945;26(3):251-73.
63. Coleman GJ, Hay M. Anticipatory wheel-running in behaviorally anosmic rats. *Physiology & behavior.* 1990 Jun;47(6):1145-51. PubMed PMID: 2395919. Epub 1990/06/01. eng.
64. Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain research.* 1992 Aug 7;587(2):181-5. PubMed PMID: 1525654. Epub 1992/08/07. eng.
65. Hall JF, Smith K, Schnitzer SB, Hanford PV. Elevation of activity level in the rat following transition from ad libitum to restricted feeding. *J Comp Physiol Psychol.* 1953 Dec;46(6):429-33. PubMed PMID: 13109066. Epub 1953/12/01. eng.
66. Nicol CJ. Behavioural responses of laying hens following a period of spatial restriction. *Animal Behaviour.* 1987 1987/12/01;35(6):1709-19.
67. Brant DH, Kavanau JL. 'UNREWARDED' EXPLORATION AND LEARNING OF COMPLEX MAZES BY WILD AND DOMESTIC MICE. *Nature.* 1964 Oct 17;204:267-9. PubMed PMID: 14212425. Epub 1964/10/17. eng.
68. Brant DH, Kavanau JL. Exploration and Movement Patterns of the Canyon Mouse *Peromyscus Crinitus* in an Extensive Laboratory Enclosure. *Ecology.* 1965;46(4):452-61.
69. Muri K, & Sherwin, C. M. Laboratory mice show a lack of directionality in wheel-running. In: Ed. by I. J. H. Duncan TMWDBH, editor. *Proceedings of the 30th International Congress of the International Society for Applied Ethology.* Guelph, Canada, The Colonel K. L. Campbell Centre for the Study of Animal Welfare. 1996. p. 122.
70. Vallerand RJ. Intrinsic and Extrinsic Motivation in Sport and Physical Activity: A Review and a Look at the Future. *Handbook of Sport Psychology: John Wiley & Sons, Inc.;* 2007. p. 59-83.
71. Parish LE, Treasure DC. Physical activity and situational motivation in physical education: influence of the motivational climate and perceived ability. *Research quarterly for exercise and sport.* 2003 Jun;74(2):173-82. PubMed PMID: 12848230. Epub 2003/07/10. eng.
72. Aarts H, Paulussen T, Schaalma H. Physical exercise habit: on the conceptualization and formation of habitual health behaviours. *Health education research.* 1997 Sep;12(3):363-74. PubMed PMID: 10174219. Epub 1997/08/05. eng.
73. Koob GF. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry.* 2009 May;42 Suppl 1:S32-41. PubMed PMID: 19434554. Pubmed Central PMCID: PMC2739305. Epub 2009/05/13. eng.

74. Adinoff B. Neurobiologic Processes in Drug Reward and Addiction. Harvard review of psychiatry. 2004;12(6):305-20. PubMed PMID: PMC1920543.
75. Haber SN. Neuroanatomy of Reward: A View from the Ventral Striatum Neurobiology of Sensation and Reward. Gottfried JA, editor. Boca Raton FL: Llc.; 2011.
76. Heatherton TF, Wagner DD. Cognitive Neuroscience of Self-Regulation Failure. Trends in cognitive sciences. 2011 01/26;15(3):132-9. PubMed PMID: PMC3062191.
77. Karbach J, Schubert T. Training-induced cognitive and neural plasticity. Frontiers in Human Neuroscience. 2013 02/2201/31/received02/05/accepted;7:48. PubMed PMID: PMC3579194.
78. McClure SM, Laibson DI, Loewenstein G, Cohen JD. Separate neural systems value immediate and delayed monetary rewards. Science (New York, NY). 2004 Oct 15;306(5695):503-7. PubMed PMID: 15486304. Epub 2004/10/16. eng.
79. Appelhans BM, Woolf K, Pagoto SL, Schneider KL, Whited MC, Liebman R. Inhibiting food reward: delay discounting, food reward sensitivity, and palatable food intake in overweight and obese women. Obesity (Silver Spring, Md). 2011 04/07;19(11):2175-82. PubMed PMID: PMC3303186.
80. Bothe N, Zschucke E, Dimeo F, Heinz A, Wustenberg T, Strohle A. Acute exercise influences reward processing in highly trained and untrained men. Medicine and science in sports and exercise. 2013 Mar;45(3):583-91. PubMed PMID: 23059859. Epub 2012/10/13. eng.
81. Yamatani K, Ono T, Nishijo H, Takaku A. Activity and distribution of learning-related neurons in monkey (*Macaca fuscata*) prefrontal cortex. Behavioral neuroscience. 1990 Aug;104(4):503-31. PubMed PMID: 2206423. Epub 1990/08/01. eng.
82. Schultz W. Multiple reward signals in the brain. Nature reviews Neuroscience. 2000 12//print;1(3):199-207.
83. Berridge Kent C, Kringelbach Morten L. Pleasure Systems in the Brain. Neuron. 2015 5/6;86(3):646-64.
84. Koob GF, Le Moal M. Addiction and the brain antireward system. Annual review of psychology. 2008;59:29-53. PubMed PMID: 18154498. Epub 2007/12/25. eng.
85. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. Nature reviews Neuroscience. 2013 Sep;14(9):609-25. PubMed PMID: 23942470. Pubmed Central PMCID: PMC3867253. Epub 2013/08/15. eng.
86. INSERM. Médicaments psychotropes : Consommations et pharmacodépendances. Paris2012.
87. Jarius S, Wildemann B. And Pavlov still rings a bell: summarising the evidence for the use of a bell in Pavlov's iconic experiments on classical conditioning. Journal of neurology. 2015 Sep;262(9):2177-8. PubMed PMID: 26259561. Epub 2015/08/12. eng.
88. Tomazi L, Mello CF, Schoffer AP, Girardi BA, Fruhauf PK, Rubin MA. A Nonrewarding NMDA Receptor Antagonist Impairs the Acquisition, Consolidation, and Expression of Morphine Conditioned Place Preference in Mice. Molecular neurobiology. 2016 Jan 14. PubMed PMID: 26768427. Epub 2016/01/16. Eng.

89. Corbit LH, Janak PH, Balleine BW. General and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer: the effect of shifts in motivational state and inactivation of the ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience*. 2007 Dec;26(11):3141-9. PubMed PMID: 18005062. Epub 2007/11/17. eng.
90. Fulton S. Appetite and reward. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010 Jan;31(1):85-103. PubMed PMID: 19822167. Epub 2009/10/14. eng.
91. Milner PM. Brain-stimulation reward: a review. *Canadian journal of psychology*. 1991 Mar;45(1):1-36. PubMed PMID: 2044020. Epub 1991/03/01. eng.
92. Wise RA, Bozarth MA. Brain reward circuitry: four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain research bulletin*. 1984 Feb;12(2):203-8. PubMed PMID: 6609751. Epub 1984/02/01. eng.
93. Phillips AG. Brain reward circuitry: a case for separate systems. *Brain research bulletin*. 1984 Feb;12(2):195-201. PubMed PMID: 6609750. Epub 1984/02/01. eng.
94. Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*. 2002 Oct 10;36(2):229-40. PubMed PMID: 12383779. Epub 2002/10/18. eng.
95. Balleine BW, Delgado MR, Hikosaka O. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *The Journal of Neuroscience*. 2007 August 1, 2007;27(31):8161-5.
96. Schiltz CA. Habitual responding and the dorsal striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006 Feb 15;26(7):1891-2. PubMed PMID: 16481419. Epub 2006/02/17. eng.
97. Gallagher M, Chiba AA. The amygdala and emotion. *Current opinion in neurobiology*. 1996 Apr;6(2):221-7. PubMed PMID: 8725964. Epub 1996/04/01. eng.
98. Leuner B, Gould E. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual review of psychology*. 2010;61:111-C3. PubMed PMID: PMC3012424.
99. Bjorklund A, Dunnett SB. Fifty years of dopamine research. *Trends in neurosciences*. 2007 May;30(5):185-7. PubMed PMID: 17397938. Epub 2007/04/03. eng.
100. Servier LL. *Neurology - Nervous System 2016* [updated 2016; cited 2016 March 20th].
101. Dube L, Smith AD, Bolam JP. Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *The Journal of comparative neurology*. 1988 Jan 22;267(4):455-71. PubMed PMID: 3346370. Epub 1988/01/22. eng.
102. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*. 2014 08/print;17(8):1022-30.
103. Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology*. 1980;14(2-3):69-97. PubMed PMID: 6999537. Epub 1980/01/01. eng.
104. Wise RA, Hoffman DC. Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. *Synapse (New York, NY)*. 1992 Mar;10(3):247-63. PubMed PMID: 1557697. Epub 1992/03/01. eng.
105. Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *The Journal of*



- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2003 Apr 1;23(7):2882-8. PubMed PMID: 12684475. Epub 2003/04/10. eng.
106. Damsma G, Pfaus JG, Wenkstern D, Phillips AG, Fibiger HC. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behavioral neuroscience*. 1992 Feb;106(1):181-91. PubMed PMID: 1313243. Epub 1992/02/01. eng.
  107. Ruegsegger G, Toedebusch R, Booth F. Physical Activity Motivation: are Nucleus Accumbens Dopamine and Opioid Signaling Involved. *The FASEB Journal*. 2015 April 1, 2015;29(1 Supplement).
  108. Koob GF, Le Moal M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 2001 2//;24(2):97-129.
  109. Sprouse-Blum AS, Smith G, Sugai D, Parsa FD. Understanding Endorphins and Their Importance in Pain Management. *Hawaii Medical Journal*. 2010;69(3):70-1. PubMed PMID: PMC3104618.
  110. Andersson LI, Müller R, Vlatakis G, Mosbach K. Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):4788-92. PubMed PMID: PMC41792.
  111. Bozarth MA, Wise RA. Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science (New York, NY)*. 1984 May 4;224(4648):516-7. PubMed PMID: 6324347. Epub 1984/05/04. eng.
  112. Merrer JL, Becker JAJ, Befort K, Kieffer BL. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological reviews*. 2009;89(4):1379-412. PubMed PMID: PMC4482114.
  113. Van Ree JM, Niesink RJM, Van Wolfswinkel L, Ramsey NF, Kornet MMW, Van Furth WR, et al. Endogenous opioids and reward. *European journal of pharmacology*. 2000 9/29;405(1-3):89-101.
  114. Wei E, Loh H. Physical dependence of opiate-like peptides. *Science (New York, NY)*. 1976 Sep 24;193(4259):1262-3. PubMed PMID: 986687. Epub 1976/09/24. eng.
  115. van Ree JM, de Wied D, Bradbury AF, Hulme EC, Smyth DC, Snell CR. Induction of tolerance to the analgesic action of lipotropin in C-fragment. *Nature*. 1976 Dec 23-30;264(5588):792-4. PubMed PMID: 1012322. Epub 1976/12/23. eng.
  116. Belluzzi JD, Stein L. Enkephalin may mediate euphoria and drive-reduction reward. *Nature*. 1977 Apr 7;266(5602):556-8. PubMed PMID: 193035. Epub 1977/04/07. eng.
  117. van Ree JM, Smyth DG, Colpaert FC. Dependence creating properties of lipotropin C-fragment (beta-endorphin): evidence for its internal control of behavior. *Life sciences*. 1979 Feb 5;24(6):495-502. PubMed PMID: 571036. Epub 1979/02/05. eng.
  118. Baimel C, Bartlett SE, Chiou LC, Lawrence AJ, Muschamp JW, Patkar O, et al. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions. *British journal of pharmacology*. 2015 Jan;172(2):334-48. PubMed PMID: 24641197. Pubmed Central PMCID: PMC4292951. Epub 2014/03/20. eng.
  119. Al-Hasani R, McCall JG, Shin G, Gomez AM, Schmitz GP, Bernardi JM, et al. Distinct Subpopulations of Nucleus Accumbens Dynorphin Neurons Drive Aversion

- and Reward. *Neuron*. 2015 Sep 2;87(5):1063-77. PubMed PMID: 26335648. Pubmed Central PMCID: PMC4625385. Epub 2015/09/04. eng.
120. Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992 Feb;12(2):483-8. PubMed PMID: 1346804. Epub 1992/02/01. eng.
  121. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(6):2046-50. PubMed PMID: PMC48593.
  122. Steiner H, Gerfen CR. Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1993 Dec;13(12):5066-81. PubMed PMID: 7504719. Epub 1993/12/01. eng.
  123. Shippenberg TS. The dynorphin/kappa opioid receptor system: a new target for the treatment of addiction and affective disorders[quest]. *Neuropsychopharmacology*. 2009 //print;34(1):247-.
  124. Koob GF, Le Moal M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci*. 2005 11//print;8(11):1442-4.
  125. Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain research reviews*. 2007 08/21;56(2):283-321. PubMed PMID: PMC2238694.
  126. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews Neuroscience*. 2001 Feb;2(2):119-28. PubMed PMID: 11252991. Epub 2001/03/17. eng.
  127. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*. 2007;64(3):327-37.
  128. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2011 March 1, 2011;63(1):182-217.
  129. Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends in neurosciences*. 2007 May;30(5):203-10. PubMed PMID: 17400301. Epub 2007/04/03. eng.
  130. Grace AA, Bunney BS. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience*. 1983 Oct;10(2):301-15. PubMed PMID: 6633863. Epub 1983/10/01. eng.
  131. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in neurosciences*. 2007 May;30(5):220-7. PubMed PMID: 17400299. Epub 2007/04/03. eng.
  132. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*. 2005 Jun 2;46(5):703-13. PubMed PMID: 15924857. Epub 2005/06/01. eng.
  133. Goto Y, Grace AA. Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nat Neurosci*. 2005 06//print;8(6):805-12.

134. Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*. 1991;41(1):1-24. PubMed PMID: 1676137. Epub 1991/01/01. eng.
135. Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*. 2002 Oct 10;36(2):241-63. PubMed PMID: 12383780. Epub 2002/10/18. eng.
136. Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & behavior*. 2005 Dec 15;86(5):773-95. PubMed PMID: 16289609. Epub 2005/11/18. eng.
137. Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Current opinion in pharmacology*. 2005 Feb;5(1):34-41. PubMed PMID: 15661623. Epub 2005/01/22. eng.
138. Pierce RC, Kumaresan V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2006 //;30(2):215-38.
139. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews Neuroscience*. 2004 06//print;5(6):483-94.
140. Steinberg EE, Boivin JR, Saunders BT, Witten IB, Deisseroth K, Janak PH. Positive Reinforcement Mediated by Midbrain Dopamine Neurons Requires D1 and D2 Receptor Activation in the Nucleus Accumbens. *PloS one*. 2014 04/1410/16/received03/20/accepted;9(4):e94771. PubMed PMID: PMC3986242.
141. Thiel KJ, Wenzel JM, Pentkowski NS, Hobbs RJ, Alleweireldt AT, Neisewander JL. Stimulation of dopamine D2/D3 but not D1 receptors in the central amygdala decreases cocaine-seeking behavior. *Behavioural brain research*. 2010 06/19;214(2):386-94. PubMed PMID: PMC3071986.
142. Knab AM, Lightfoot JT. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *International journal of biological sciences*. 2010;6(2):133-50. PubMed PMID: 20224735. Pubmed Central PMCID: PMC2836544. Epub 2010/03/13. eng.
143. Correa M, Pardo M, Bayarri P, Lopez-Cruz L, San Miguel N, Valverde O, et al. Choosing voluntary exercise over sucrose consumption depends upon dopamine transmission: effects of haloperidol in wild type and adenosine A2AKO mice. *Psychopharmacology*. 2016 Feb;233(3):393-404. PubMed PMID: 26554387. Epub 2015/11/12. eng.
144. Tomas D, Prijanto AH, Burrows EL, Hannan AJ, Horne MK, Aumann TD. Environmental modulations of the number of midbrain dopamine neurons in adult mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2015 (95):52329. PubMed PMID: 25650697. Epub 2015/02/05. eng.
145. Roberts MD, Toedebusch RG, Wells KD, Company JM, Brown JD, Cruthirds CL, et al. Nucleus accumbens neuronal maturation differences in young rats bred for low versus high voluntary running behaviour. *The Journal of physiology*. 2014 May 15;592(Pt 10):2119-35. PubMed PMID: 24665095. Pubmed Central PMCID: PMC4227898. Epub 2014/03/26. eng.
146. Roberts MD, Gilpin L, Parker KE, Childs TE, Will MJ, Booth FW. Dopamine D1 receptor modulation in nucleus accumbens lowers voluntary wheel running in rats

bred to run high distances. *Physiology & behavior*. 2012 Feb 1;105(3):661-8. PubMed PMID: 22001493. Epub 2011/10/18. eng.

147. Wilson WM, Marsden CA. Extracellular dopamine in the nucleus accumbens of the rat during treadmill running. *Acta physiologica Scandinavica*. 1995 Dec;155(4):465-6. PubMed PMID: 8719267. Epub 1995/12/01. eng.

148. Greenwood BN, Foley TE, Le TV, Strong PV, Loughridge AB, Day HEW, et al. Long term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behavioural brain research*. 2011 11/09;217(2):354-62. PubMed PMID: PMC3021978.

149. Herrera JJ, Fedynska S, Ghasem PR, Wieman T, Clark PJ, Gray N, et al. Neurochemical and behavioral indices of exercise reward are independent of exercise controllability. *The European journal of neuroscience*. 2016 Feb 1. PubMed PMID: 26833814. Epub 2016/02/03. Eng.

150. Kanarek RB, D'Anci KE, Jurdak N, Mathes WF. Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activity-based anorexia. *Behavioral neuroscience*. 2009;123(4):905-12. PubMed PMID: PMC2786257.

151. Antunes HK, Leite GS, Lee KS, Barreto AT, Santos RV, Souza Hde S, et al. Exercise deprivation increases negative mood in exercise-addicted subjects and modifies their biochemical markers. *Physiology & behavior*. 2016 Mar 15;156:182-90. PubMed PMID: 26812592. Epub 2016/01/27. eng.

152. Hoffmann P, Terenius L, Thorén P. Cerebrospinal fluid immunoreactive  $\beta$ -endorphin concentration is increased by voluntary exercise in the spontaneously hypertensive rat. *Regulatory Peptides*. 1990 1990/04/24;28(2):233-9.

153. Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science (New York, NY)*. 1997 Oct 3;278(5335):52-8. PubMed PMID: 9311926. Epub 1997/10/06. eng.

154. Werme M, Thoren P, Olson L, Brene S. Addiction-prone Lewis but not Fischer rats develop compulsive running that coincides with downregulation of nerve growth factor inducible-B and neuron-derived orphan receptor 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999 Jul 15;19(14):6169-74. PubMed PMID: 10407052. Epub 1999/07/17. eng.

155. Afonso VM, Eikelboom R. Relationship between wheel running, feeding, drinking, and body weight in male rats. *Physiology & behavior*. 2003 Oct;80(1):19-26. PubMed PMID: 14568304. Epub 2003/10/22. eng.

156. Lett BT, Grant VL, Koh MT, Flynn G. Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002 5//;72(1-2):101-5.

157. Larson EB, Carroll ME. Wheel running as a predictor of cocaine self-administration and reinstatement in female rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2005 Nov;82(3):590-600. PubMed PMID: 16337260. Epub 2005/12/13. eng.

158. Freimuth M, Moniz S, Kim SR. Clarifying Exercise Addiction: Differential Diagnosis, Co-occurring Disorders, and Phases of Addiction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011 10/2109/06/received10/08/revised10/17/accepted;8(10):4069-81. PubMed PMID: PMC3210598.

159. Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thoren P, Nestler EJ, et al. Delta FosB regulates wheel running. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002 Sep 15;22(18):8133-8. PubMed PMID: 12223567. Epub 2002/09/12. eng.
160. Morris MJ, Na ES, Johnson AK. Voluntary Running-Wheel Exercise Decreases the Threshold for Rewarding Intracranial Self-Stimulation. *Behavioral neuroscience*. 2012;126(4):582-7. PubMed PMID: PMC4433312.
161. Collier G. HE. Reinforcing properties of spontaneous activity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1971;77:6.
162. Partin C. Runners 'high'. *JAMA*. 1983;249(1):21-.
163. Berse T, Rolfes K, Barenberg J, Dutke S, Kühlenbaumer G, Volker K, et al. Acute physical exercise improves shifting in adolescents at school: evidence for a dopaminergic contribution. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2015;9:196. PubMed PMID: 26283937. Pubmed Central PMCID: PMC4517060. Epub 2015/08/19. eng.
164. Boecker H, Sprenger T, Spilker ME, Henriksen G, Koppenhoefer M, Wagner KJ, et al. The Runner's High: Opioidergic Mechanisms in the Human Brain. *Cerebral Cortex*. 2008 November 1, 2008;18(11):2523-31.
165. Lett BT, Grant VL, Byrne MJ, Koh MT. Pairings of a distinctive chamber with the aftereffect of wheel running produce conditioned place preference. *Appetite*. 2000 Feb;34(1):87-94. PubMed PMID: 10744895. Epub 2000/04/04. eng.
166. Lett BT, Grant VL, Koh MT. Naloxone attenuates the conditioned place preference induced by wheel running in rats. *Physiology & behavior*. 2001 2//;72(3):355-8.
167. Lindholm S, Ploj K, Franck J, Nylander I. Repeated ethanol administration induces short- and long-term changes in enkephalin and dynorphin tissue concentrations in rat brain. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2000 Nov;22(3):165-71. PubMed PMID: 11163124. Epub 2001/02/13. eng.
168. Li G, Rhodes JS, Girard I, Gammie SC, Garland Jr T. Opioid-mediated pain sensitivity in mice bred for high voluntary wheel running. *Physiology & behavior*. 2004 12/15//;83(3):515-24.
169. Bjornebekk A, Mathe AA, Brene S. Running has differential effects on NPY, opiates, and cell proliferation in an animal model of depression and controls. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Feb;31(2):256-64. PubMed PMID: 16034445. Epub 2005/07/22. eng.
170. Werme M, Thoren P, Olson L, Brene S. Running and cocaine both upregulate dynorphin mRNA in medial caudate putamen. *The European journal of neuroscience*. 2000 Aug;12(8):2967-74. PubMed PMID: 10971637. Epub 2000/09/06. eng.
171. Raichlen DA, Foster AD, Gerdeman GL, Seillier A, Giuffrida A. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the 'runner's high'. *The Journal of experimental biology*. 2012 Apr 15;215(Pt 8):1331-6. PubMed PMID: 22442371. Epub 2012/03/24. eng.
172. Dubreucq S, Durand A, Matias I, Benard G, Richard E, Soria-Gomez E, et al. Ventral tegmental area cannabinoid type-1 receptors control voluntary exercise performance. *Biological psychiatry*. 2013 May 1;73(9):895-903. PubMed PMID: 23237313. Epub 2012/12/15. eng.

173. Galdino G, Romero TR, Silva JF, Aguiar DC, de Paula AM, Cruz JS, et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology*. 2014 Feb;77:313-24. PubMed PMID: 24148812. Epub 2013/10/24. eng.
174. Hill MN, Titterness AK, Morrish AC, Carrier EJ, Lee TT, Gil-Mohapel J, et al. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*. 2010 Apr;20(4):513-23. PubMed PMID: 19489006. Pubmed Central PMCID: PMC2847038. Epub 2009/06/03. eng.
175. Kirkham TC, Williams CM. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutrition research reviews*. 2001 Jun;14(1):65-86. PubMed PMID: 19087417. Epub 2001/06/01. eng.
176. Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, MacKie K. Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience*. 2004;127(1):101-12. PubMed PMID: 15219673. Epub 2004/06/29. eng.
177. Caille S, Parsons LH. Cannabinoid modulation of opiate reinforcement through the ventral striatopallidal pathway. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Apr;31(4):804-13. PubMed PMID: 16123766. Epub 2005/08/27. eng.
178. Pecina S, Smith KS, Berridge KC. Hedonic hot spots in the brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2006 Dec;12(6):500-11. PubMed PMID: 17079516. Epub 2006/11/03. eng.
179. Melis M, Pistis P. Endocannabinoid Signaling in Midbrain Dopamine Neurons: More than Physiology? *Current Neuropharmacology*. 2007 02/13/received03/30/revised04/03/accepted;5(4):268-77. PubMed PMID: PMC2644494.
180. Gardner EL. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2005 Jun;81(2):263-84. PubMed PMID: 15936806. Epub 2005/06/07. eng.
181. Patrick RP, Ames BN. Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behavior. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015 Jun;29(6):2207-22. PubMed PMID: 25713056. Epub 2015/02/26. eng.
182. Meeusen R, De Meirleir K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1995 Sep;20(3):160-88. PubMed PMID: 8571000. Epub 1995/09/01. eng.
183. Dey S, Singh RH, Dey PK. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. *Physiology & behavior*. 1992 Dec;52(6):1095-9. PubMed PMID: 1283013. Epub 1992/12/01. eng.
184. Fulton S, Pissios P, Manchon Ramon P, Stiles L, Frank L, Pothos EN, et al. Leptin Regulation of the Mesoaccumbens Dopamine Pathway. *Neuron*. 2006 9/21;51(6):811-22.

185. Austin J, Marks D. Hormonal Regulators of Appetite. *International Journal of Pediatric Endocrinology*. 2009 12/0311/11/received11/18/accepted;2009:141753. PubMed PMID: PMC2777281.
186. Hazell TJ, Islam H, Townsend LK, Schmale MS, Copeland JL. Effects of exercise intensity on plasma concentrations of appetite-regulating hormones: Potential mechanisms. *Appetite*. 2016 Mar 1;98:80-8. PubMed PMID: 26721721. Epub 2016/01/02. eng.
187. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutrition reviews*. 2002 Oct;60(10 Pt 2):S1-14; discussion S68-84, 5-7. PubMed PMID: 12403078. Epub 2002/10/31. eng.
188. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001 05/24/print;411(6836):480-4.
189. Korner J, Savontaus E, Chua SC, Jr., Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*. 2001 Nov;13(11):959-66. PubMed PMID: 11737554. Epub 2001/12/12. eng.
190. Baver SB, Hope K, Guyot S, Bjorbaek C, Kaczorowski C, O'Connell KM. Leptin modulates the intrinsic excitability of *AgRP/NPY* neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014 Apr 16;34(16):5486-96. PubMed PMID: 24741039. Pubmed Central PMCID: PMC4298648. Epub 2014/04/18. eng.
191. Chua SC, Jr., Liu SM, Li Q, Sun A, DeNino WF, Heymsfield SB, et al. Transgenic complementation of leptin receptor deficiency. II. Increased leptin receptor transgene dose effects on obesity/diabetes and fertility/lactation in *lepr-db/db* mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004 Mar;286(3):E384-92. PubMed PMID: 14600075. Epub 2003/11/06. eng.
192. Robertson SA, Leininger GM, Myers MG, Jr. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiology & behavior*. 2008 Aug 6;94(5):637-42. PubMed PMID: 18501391. Pubmed Central PMCID: PMC2516921. Epub 2008/05/27. eng.
193. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*. 2006 12/1209/26/received10/07/revised10/07/accepted;393(Pt 1):7-20. PubMed PMID: PMC1383660.
194. Donato J, Jr., Frazao R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010 Oct;54(7):591-602. PubMed PMID: 21085763. Epub 2010/11/19. eng.
195. Leshan RL, Bjornholm M, Munzberg H, Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2006 Aug;14 Suppl 5:208S-12S. PubMed PMID: 17021368. Epub 2006/10/06. eng.
196. Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain research*. 2003 Feb 21;964(1):107-15. PubMed PMID: 12573518. Epub 2003/02/08. eng.
197. Liu J, Perez SM, Zhang W, Lodge DJ, Lu XY. Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increases dopaminergic activity in amygdala. *Molecular psychiatry*. 2011 Oct;16(10):1024-38.

- PubMed PMID: 21483433. Pubmed Central PMCID: PMC3432580. Epub 2011/04/13. eng.
198. Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. *Psychopharmacology*. 2010 Jan;207(4):535-45. PubMed PMID: 19823809. Pubmed Central PMCID: PMC4057895. Epub 2009/10/14. eng.
  199. Figlewicz DP, Bennett J, Evans SB, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC. Intraventricular insulin and leptin reverse place preference conditioned with high-fat diet in rats. *Behavioral neuroscience*. 2004 Jun;118(3):479-87. PubMed PMID: 15174925. Epub 2004/06/04. eng.
  200. Figlewicz DP, Bennett JL, Naleid AM, Davis C, Grimm JW. Intraventricular insulin and leptin decrease sucrose self-administration in rats. *Physiology & behavior*. 2006 Nov 30;89(4):611-6. PubMed PMID: 17045623. Epub 2006/10/19. eng.
  201. Domingos AI, Vaynshteyn J, Voss HU, Ren X, Gradinaru V, Zang F, et al. Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nat Neurosci*. 2011 Dec;14(12):1562-8. PubMed PMID: 22081158. Pubmed Central PMCID: PMC4238286. Epub 2011/11/15. eng.
  202. You ZB, Wang B, Liu QR, Wu Y, Otvos L, Wise RA. Reciprocal Inhibitory Interactions Between the Reward-Related Effects of Leptin and Cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Aug 5. PubMed PMID: 26243270. Epub 2015/08/06. Eng.
  203. Grosshans M, Loeber S, Kiefer F. Implications from addiction research towards the understanding and treatment of obesity. *Addiction biology*. 2011 Apr;16(2):189-98. PubMed PMID: 21371174. Epub 2011/03/05. eng.
  204. Kiefer F, Jahn H, Otte C, Demiralay C, Wolf K, Wiedemann K. Increasing leptin precedes craving and relapse during pharmacological abstinence maintenance treatment of alcoholism. *Journal of psychiatric research*. 2005 Sep;39(5):545-51. PubMed PMID: 15992564. Epub 2005/07/05. eng.
  205. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006 Sep 21;51(6):801-10. PubMed PMID: 16982424. Epub 2006/09/20. eng.
  206. Opland DM, Leininger GM, Myers MG, Jr. Modulation of the mesolimbic dopamine system by leptin. *Brain research*. 2010 Sep 2;1350:65-70. PubMed PMID: 20417193. Pubmed Central PMCID: PMC2921997. Epub 2010/04/27. eng.
  207. Trinko R, Gan G, Gao XB, Sears RM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ. Erk1/2 mediates leptin receptor signaling in the ventral tegmental area. *PloS one*. 2011;6(11):e27180. PubMed PMID: 22076135. Pubmed Central PMCID: PMC3208604. Epub 2011/11/15. eng.
  208. Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, et al. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab*. 2009 Aug;10(2):89-98. PubMed PMID: 19656487. Pubmed Central PMCID: PMC2723060. Epub 2009/08/07. eng.
  209. Roseberry AG, Painter T, Mark GP, Williams JT. Decreased vesicular somatodendritic dopamine stores in leptin-deficient mice. *The Journal of*



- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2007 Jun 27;27(26):7021-7. PubMed PMID: 17596451. Epub 2007/06/29. eng.
210. Krugel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P. Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *European journal of pharmacology*. 2003 Dec 15;482(1-3):185-7. PubMed PMID: 14660021. Epub 2003/12/09. eng.
211. Perry ML, Leinninger GM, Chen R, Luderman KD, Yang H, Gnegy ME, et al. Leptin promotes dopamine transporter and tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of Sprague-Dawley rats. *Journal of neurochemistry*. 2010 Aug;114(3):666-74. PubMed PMID: 20412389. Pubmed Central PMCID: PMC2910163. Epub 2010/04/24. eng.
212. Fulton S, Richard D, Woodside B, Shizgal P. Food restriction and leptin impact brain reward circuitry in lean and obese Zucker rats. *Behavioural Brain Research*. 2004 12/6;155(2):319-29.
213. Fulton S, Woodside B, Shizgal P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science (New York, NY)*. 2000 Jan 7;287(5450):125-8. PubMed PMID: 10615045. Epub 1999/12/30. eng.
214. Figlewicz DP, Benoit SC. Insulin, leptin, and food reward: update 2008. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009 Jan;296(1):R9-R19. PubMed PMID: 18945945. Pubmed Central PMCID: PMC2636975. Epub 2008/10/24. eng.
215. Thompson JL, Borgland SL. Presynaptic leptin action suppresses excitatory synaptic transmission onto ventral tegmental area dopamine neurons. *Biological psychiatry*. 2013 May 1;73(9):860-8. PubMed PMID: 23305991. Epub 2013/01/12. eng.
216. Davis JF, Choi DL, Schurdak JD, Fitzgerald MF, Clegg DJ, Lipton JW, et al. Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biological psychiatry*. 2011 Apr 1;69(7):668-74. PubMed PMID: 21035790. Pubmed Central PMCID: PMC3058141. Epub 2010/11/03. eng.
217. Meek TH, Dlugosz EM, Vu KT, Garland T, Jr. Effects of leptin treatment and Western diet on wheel running in selectively bred high runner mice. *Physiology & behavior*. 2012 May 15;106(2):252-8. PubMed PMID: 22361262. Epub 2012/03/01. eng.
218. Morton GJ, Kaiyala KJ, Fisher JD, Ogimoto K, Schwartz MW, Wisse BE. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011 Feb;300(2):E392-401. PubMed PMID: 21062956. Pubmed Central PMCID: PMC3043625. Epub 2010/11/11. eng.
219. Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, et al. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Molecular psychiatry*. 2000 Sep;5(5):476-81. PubMed PMID: 11032380. Epub 2000/10/14. eng.
220. Verhagen LA, Luijendijk MC, Adan RA. Leptin reduces hyperactivity in an animal model for anorexia nervosa via the ventral tegmental area. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of*

- Neuropsychopharmacology. 2011 Mar;21(3):274-81. PubMed PMID: 21190812. Epub 2010/12/31. eng.
221. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996 Jul 18;382(6588):250-2. PubMed PMID: 8717038. Epub 1996/07/18. eng.
222. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, et al. Effects of Recombinant Leptin Therapy in a Child with Congenital Leptin Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(12):879-84. PubMed PMID: 10486419.
223. Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Mar 30;101(13):4531-6. PubMed PMID: 15070752. Pubmed Central PMCID: PMC384781. Epub 2004/04/09. eng.
224. Choi YH, Li C, Hartzell DL, Little DE, Della-Fera MA, Baile CA. ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2008 Mar 17;188(1):100-8. PubMed PMID: 18063139. Epub 2007/12/08. eng.
225. Franks PW, Farooqi IS, Luan J, Wong MY, Halsall I, O'Rahilly S, et al. Does physical activity energy expenditure explain the between-individual variation in plasma leptin concentrations after adjusting for differences in body composition? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Jul;88(7):3258-63. PubMed PMID: 12843173. Epub 2003/07/05. eng.
226. Hebebrand J, Exner C, Hebebrand K, Holtkamp C, Casper RC, Remschmidt H, et al. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiology & behavior*. 2003 Jun;79(1):25-37. PubMed PMID: 12818707. Epub 2003/06/24. eng.
227. Bobbert T, Mai K, Brechtel L, Schulte HM, Weger B, Pfeiffer AF, et al. Leptin and endocrine parameters in marathon runners. *International journal of sports medicine*. 2012 Mar;33(3):244-8. PubMed PMID: 22261828. Epub 2012/01/21. eng.
228. Girard I, Rezende EL, Garland T, Jr. Leptin levels and body composition of mice selectively bred for high voluntary locomotor activity. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*. 2007 Nov-Dec;80(6):568-79. PubMed PMID: 17909994. Epub 2007/10/03. eng.
229. Morton GJ, Blevins JE, Kim F, Matsen M, Figlewicz DP. The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 200905/1210/17/received05/06/accepted;297(1):E202-E10. PubMed PMID: PMC2711664.
230. Buettner C, Poci A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG, Rossetti L. Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell metabolism*. 2006;4(1):49-60. PubMed PMID: PMC3638026.
231. Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009 5//;1792(5):401-8.

232. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, et al. Leptin targets in the mouse brain. *The Journal of comparative neurology*. 2009 Jun 10;514(5):518-32. PubMed PMID: 19350671. Pubmed Central PMCID: PMC2710238. Epub 2009/04/08. eng.
233. Takeda K, Sato H, Hino T, Kono M, Fukuda K, Sakurai I, et al. A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive fusion of the vesicular assemblies. *Journal of molecular biology*. 1998 Oct 23;283(2):463-74. PubMed PMID: 9769218. Epub 1998/10/14. eng.
234. Backman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, et al. Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2006 Aug;44(8):383-90. PubMed PMID: 16865686. Epub 2006/07/26. eng.
235. Atasoy D, Aponte Y, Su HH, Sternson SM. A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(28):7025-30. PubMed PMID: PMC2593125.
236. Saunders A, Johnson C, Sabatini B. Novel recombinant adeno-associated viruses for Cre activated and inactivated transgene expression in neurons. *Frontiers in Neural Circuits*. 2012 2012-July-27;6. English.
237. Franklin Pa. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition ed2012. 360 p.
238. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010 05//print;13(5):635-41.
239. Hager T, Jansen RF, Pieneman AW, Manivannan SN, Golani I, van der Sluis S, et al. Display of individuality in avoidance behavior and risk assessment of inbred mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:314. PubMed PMID: 25278853. Pubmed Central PMCID: PMC4165351. Epub 2014/10/04. eng.
240. Klemenhausen KC, O'Brien SP, Brody DL. Repetitive concussive traumatic brain injury interacts with post-injury foot shock stress to worsen social and depression-like behavior in mice. *PloS one*. 2013;8(9):e74510. PubMed PMID: 24058581. Pubmed Central PMCID: PMC3776826. Epub 2013/09/24. eng.
241. DiLeone RJ. The influence of leptin on the dopamine system and implications for ingestive behavior. *International journal of obesity (2005)*. 2009;33(Suppl 2):S25-S9. PubMed PMID: PMC2812808.
242. Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab*. 2005 Jan;1(1):63-72. PubMed PMID: 16054045. Epub 2005/08/02. eng.
243. Sodersten P, Nergardh R, Bergh C, Zandian M, Scheurink A. Behavioral neuroendocrinology and treatment of anorexia nervosa. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2008 Oct;29(4):445-62. PubMed PMID: 18602416. Epub 2008/07/08. eng.
244. Gong L, Yao F, Hockman K, Heng HH, Morton GJ, Takeda K, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology*. 2008

Jul;149(7):3346-54. PubMed PMID: 18403487. Pubmed Central PMCID: PMC2453091. Epub 2008/04/12. eng.

245. Mesaros A, Koralov SB, Rother E, Wunderlich FT, Ernst MB, Barsh GS, et al. Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab.* 2008 Mar;7(3):236-48. PubMed PMID: 18316029. Epub 2008/03/05. eng.

246. Ernst MB, Wunderlich CM, Hess S, Paehler M, Mesaros A, Koralov SB, et al. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009 Sep 16;29(37):11582-93. PubMed PMID: 19759305. Epub 2009/09/18. eng.

247. da Silva AA, Kuo JJ, Hall JE. Role of hypothalamic melanocortin 3/4-receptors in mediating chronic cardiovascular, renal, and metabolic actions of leptin. *Hypertension.* 2004 Jun;43(6):1312-7. PubMed PMID: 15123576. Epub 2004/05/05. eng.

248. Kraemer RR, Chu H, Castracane VD. Leptin and exercise. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ).* 2002 Oct;227(9):701-8. PubMed PMID: 12324651. Epub 2002/09/27. eng.

249. Goedecke JH, St Clair Gibson A, Grobler L, Collins M, Noakes TD, Lambert EV. Determinants of the variability in respiratory exchange ratio at rest and during exercise in trained athletes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2000 Dec;279(6):E1325-34. PubMed PMID: 11093921. Epub 2000/11/30. eng.

250. Ceccarini G, Maffei M, Vitti P, Santini F. Fuel homeostasis and locomotor behavior: role of leptin and melanocortin pathways. *Journal of endocrinological investigation.* 2015 Feb;38(2):125-31. PubMed PMID: 25501840. Epub 2014/12/17. eng.

251. Mahon AD, Stephens BR, Cole AS. Exercise responses in boys with attention deficit/hyperactivity disorder: effects of stimulant medication. *Journal of attention disorders.* 2008 Sep;12(2):170-6. PubMed PMID: 17998414. Epub 2007/11/14. eng.

252. Beraldo FH, Thomas A, Kolisnyk B, Hirata PH, De Jaeger X, Martyn AC, et al. Hyperactivity and attention deficits in mice with decreased levels of stress-inducible phosphoprotein 1 (STIP1). *Disease Models & Mechanisms.* 2015 07/30/received 09/04/accepted;8(11):1457-66. PubMed PMID: PMC4631792.

253. Desgorces FD, Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Bonneau D, Guezennec CY. Leptin, catecholamines and free fatty acids related to reduced recovery delays after training. *European journal of applied physiology.* 2004 Oct;93(1-2):153-8. PubMed PMID: 15293052. Epub 2004/08/05. eng.

254. Cui Y, Huang L, Eleftheriou F, Yang G, Shelton JM, Giles JE, et al. Essential Role of STAT3 in Body Weight and Glucose Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology.* 2004 January 1, 2004;24(1):258-69.

255. Wang P, Yang FJ, Du H, Guan YF, Xu TY, Xu XW, et al. Involvement of leptin receptor long isoform (LepRb)-STAT3 signaling pathway in brain fat mass- and obesity-associated (FTO) downregulation during energy restriction. *Molecular medicine (Cambridge, Mass).* 2011 May-Jun;17(5-6):523-32. PubMed PMID: 21267512. Pubmed Central PMCID: PMC3105135. Epub 2011/01/27. eng.

256. Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):337-50. PubMed PMID: 14744442. Epub 2004/01/28. eng.
257. Yi C-X, Meyer CW, Jastroch M. Leptin action in the brain: How (and when) it makes fat burn. *Molecular Metabolism*. 2013 4//;2(2):63-4.
258. Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, et al. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*. 2001 Jun;142(6):2677-85. PubMed PMID: 11356719. Epub 2001/05/18. eng.
259. Dubinon JH, do Carmo JM, Adi A, Hamza S, da Silva AA, Hall JE. Role of proopiomelanocortin neuron Stat3 in regulating arterial pressure and mediating the chronic effects of leptin. *Hypertension*. 2013 May;61(5):1066-74. PubMed PMID: 23529161. Pubmed Central PMCID: PMC3678380. Epub 2013/03/27. eng.
260. Scheurink AJ, Boersma GJ, Nergardh R, Sodersten P. Neurobiology of hyperactivity and reward: agreeable restlessness in anorexia nervosa. *Physiology & behavior*. 2010 Jul 14;100(5):490-5. PubMed PMID: 20361989. Epub 2010/04/07. eng.
261. Keating C. Theoretical perspective on anorexia nervosa: the conflict of reward. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2010 Jan;34(1):73-9. PubMed PMID: 19619579. Epub 2009/07/22. eng.
262. Ribeiro AC, Ceccarini G, Dupre C, Friedman JM, Pfaff DW, Mark AL. Contrasting effects of leptin on food anticipatory and total locomotor activity. *PloS one*. 2011;6(8):e23364. PubMed PMID: 21853117. Pubmed Central PMCID: PMC3154408. Epub 2011/08/20. eng.
263. Arias-Carrion O, Poppel E. Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2007;67(4):481-8. PubMed PMID: 18320725. Epub 2008/03/07. eng.
264. Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):815-34. PubMed PMID: 21144997. Pubmed Central PMCID: PMC3032992. Epub 2010/12/15. eng.
265. Rhodes JS, Gammie SC, Garland T, Jr. Neurobiology of Mice Selected for High Voluntary Wheel-running Activity. *Integrative and comparative biology*. 2005 Jun;45(3):438-55. PubMed PMID: 21676789. Epub 2005/06/01. eng.
266. Rhodes JS, Garland T, Jr., Gammie SC. Patterns of brain activity associated with variation in voluntary wheel-running behavior. *Behavioral neuroscience*. 2003 Dec;117(6):1243-56. PubMed PMID: 14674844. Epub 2003/12/17. eng.
267. Rhodes JS, Garland T. Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology*. 2003 May;167(3):242-50. PubMed PMID: 12669177. Epub 2003/04/02. eng.
268. Lakhan SE, Kirchgessner A. Prescription stimulants in individuals with and without attention deficit hyperactivity disorder: misuse, cognitive impact, and adverse effects. *Brain and Behavior*. 2012 07/2304/10/received05/30/revised06/15/accepted;2(5):661-77. PubMed PMID: PMC3489818.

269. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International journal of obesity* (2005). 2013 Mar;37(3):382-9. PubMed PMID: 22508336. Epub 2012/04/18. eng.
270. Hoffmann HM, Nadal R, Vignes M, Ortiz J. Chronic cocaine self-administration modulates ERK1/2 and CREB responses to dopamine receptor agonists in striatal slices. *Addiction biology*. 2012 May;17(3):565-75. PubMed PMID: 21812869. Epub 2011/08/05. eng.
271. Park K, Volkow ND, Pan Y, Du C. Chronic cocaine dampens dopamine signaling during cocaine intoxication and unbalances D1 over D2 receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013 Oct 2;33(40):15827-36. PubMed PMID: 24089490. Pubmed Central PMCID: PMC3787501. Epub 2013/10/04. eng.
272. Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nature reviews Neuroscience*. 2010;11(7):503-13. PubMed PMID: PMC3447364.
273. Hollerman JR, Tremblay L, Schultz W. Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. *Progress in Brain Research*. Volume 126: Elsevier; 2000. p. 193-215.
274. Rolls ET, Critchley HD, Mason R, Wakeman EA. Orbitofrontal cortex neurons: role in olfactory and visual association learning. *Journal of neurophysiology*. 1996 May;75(5):1970-81. PubMed PMID: 8734596. Epub 1996/05/01. eng.
275. Lim G, Kim H, McCabe MF, Chou C-W, Wang S, Chen LL, et al. A Leptin-Mediated Central Mechanism in Analgesia-Enhanced Opioid Reward in Rats. *The Journal of Neuroscience*. 2014 01/28/received05/22/revised06/11/accepted;34(29):9779-88. PubMed PMID: PMC4099551.
276. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):822-5. PubMed PMID: 11298451. Epub 2001/04/12. eng.
277. Hasan TF, Hasan H. Anorexia Nervosa: A Unified Neurological Perspective. *International Journal of Medical Sciences*. 2011 10/2205/03/received09/19/accepted;8(8):679-703. PubMed PMID: PMC3204438.
278. Blum K, Chen AL-C, Braverman ER, Comings DE, Chen TJH, Arcuri V, et al. Attention-deficit-hyperactivity disorder and reward deficiency syndrome. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2008;4(5):893-918. PubMed PMID: PMC2626918.
279. Mu P, Neumann PA, Panksepp J, Schluter OM, Dong Y. Exposure to cocaine alters dynorphin-mediated regulation of excitatory synaptic transmission in nucleus accumbens neurons. *Biological psychiatry*. 2011 Feb 1;69(3):228-35. PubMed PMID: 21030009. Pubmed Central PMCID: PMC3790254. Epub 2010/10/30. eng.
280. Muschamp JW, Hollander JA, Thompson JL, Voren G, Hassinger LC, Onvani S, et al. Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 Apr 22;111(16):E1648-

55. PubMed PMID: 24706819. Pubmed Central PMCID: PMC4000785. Epub 2014/04/08. eng.
281. Li X, Marchant NJ, Shaham Y. Opposing roles of cotransmission of dynorphin and hypocretin on reward and motivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 03/27;111(16):5765-6. PubMed PMID: PMC4000783.
282. Calipari ES, España RA. Hypocretin/orexin regulation of dopamine signaling: implications for reward and reinforcement mechanisms. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2012 08/2105/30/received08/01/accepted;6:54. PubMed PMID: PMC3423791.
283. Bonnavion P, Jackson AC, Carter ME, de Lecea L. Antagonistic interplay between hypocretin and leptin in the lateral hypothalamus regulates stress responses. *Nat Commun*. 2015 02/19/online;6.
284. Burghardt PR, Love TM, Stohler CS, Hodgkinson C, Shen P-H, Enoch MA, et al. Leptin regulates dopamine responses to sustained stress in humans. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(44):15369-76. PubMed PMID: PMC3503485.
285. Walitza S, Melfsen S, Herhaus G, Scheuerpflug P, Warnke A, Muller T, et al. Association of Parkinson's disease with symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in childhood. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2007 (72):311-5. PubMed PMID: 17982908. Epub 2007/11/07. eng.
286. Ramsden M, Berchtold NC, Patrick Kesslak J, Cotman CW, Pike CJ. Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion. *Brain research*. 2003 May 9;971(2):239-44. PubMed PMID: 12706240. Epub 2003/04/23. eng.
287. Cannon CM, Palmiter RD. Reward without dopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003 Nov 26;23(34):10827-31. PubMed PMID: 14645475. Epub 2003/12/04. eng.
288. Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res*. 2002 Dec 2;137(1-2):165-77. PubMed PMID: 12445722. Epub 2002/11/26. eng.
289. Kolla NJ, van der Maas M, Toplak ME, Erickson PG, Mann RE, Seeley J, et al. Adult attention deficit hyperactivity disorder symptom profiles and concurrent problems with alcohol and cannabis: sex differences in a representative, population survey. *BMC psychiatry*. 2016;16(1):50. PubMed PMID: 26920911. Pubmed Central PMCID: PMC4769555. Epub 2016/02/28. eng.
290. Bulik CM, Klump KL, Thornton L, Kaplan AS, Devlin B, Fichter MM, et al. Alcohol use disorder comorbidity in eating disorders: a multicenter study. *The Journal of clinical psychiatry*. 2004 Jul;65(7):1000-6. PubMed PMID: 15291691. Epub 2004/08/05. eng.

## **ANNEXE I :**

### ***Leptin suppresses the rewarding of running via STAT3 signalling in Dopamine neurons***

Maria Fernanda A. Fernandes,<sup>1,3</sup> Dominique Matthys,<sup>1,4</sup> Cecile Hryhorczuk,<sup>1,3</sup>  
Sandeep Sharma,<sup>1,2</sup> Shabana Mogra,<sup>1</sup> Thierry Alquier,<sup>1,5</sup> and Stephanie Fulton<sup>1,2,6</sup>, \*

1-Centre de Recherche du CHUM and Montreal Diabetes Research Center

2-Department of Nutrition

3-Department of Physiology

4-Department of Neuroscience

5-Department of Medicine, Université de Montreal, QC H2X 0A9, Canada

6-Center for Studies in Behavioral Neurobiology, Concordia University, Montreal, QC H4B 1R6, Canada

Article publié dans le journal Cell Metabolism le 3 septembre 2015. Volume 22, pages 1-9

#### **Adresse Pubmed :**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26341832>

#### **Lien vers la version PDF :**

[http://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131\(15\)00394-0](http://www.cell.com/cell-metabolism/pdfExtended/S1550-4131(15)00394-0)



## **Summary**

The adipose hormone leptin potently influences physical activity. Leptin can decrease locomotion and running, yet the mechanisms involved and the influence of leptin on the rewarding effects of running (“runner’s high”) are unknown. Leptin receptor (LepR) signaling involves activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), including in dopamine neurons of the ventral tegmental area (VTA) that are essential for rewardrelevant behavior. We found that mice lacking STAT3 in dopamine neurons exhibit greater voluntary running, an effect reversed by viral-mediated STAT3 restoration. STAT3 deletion increased the rewarding effects of running whereas intra-VTA leptin blocked it in a STAT3-dependent manner. Finally, STAT3 loss-of-function reduced mesolimbic dopamine overflow and function. Findings suggest that leptin influences the motivational effects of running via LepR-STAT3 modulation of dopamine tone. Falling leptin is hypothesized to increase stamina and the rewarding effects of running as an adaptive means to enhance the pursuit and procurement of food.

## **Highlights**

STAT3 signalling in midbrain dopamine neurons is a key modulator of spontaneous and voluntary physical activity and the rewarding effects of running.

Leptin in the ventral tegmental area fully blocks the rewarding effects of running in a manner that depends on STAT3 in dopamine neurons.

Loss of STAT3 in dopamine neurons blunts nucleus accumbens dopamine overflow and mesolimbic dopamine function.

## **Introduction**

All behavior entails energy expenditure in the form of physical activity. Activity that increases the likelihood that a physiological need will be met is referred to as appetitive, and appetitive behaviors are crucial to the fulfillment of energy demands. Food directed appetitive behaviors such as foraging and hunting benefit from increased activity and stamina. The capacity for endurance running in mammals is considered to have evolved as a means to increase the payoff of food-directed behaviors targeting distant or shifting food sources (Bramble and Lieberman, 2004; Carrier, 1984). Physical activity is strongly influenced by metabolic state. The adiposity hormone leptin controls feeding and energy expenditure, and a fall in leptin is a major component of the physiological response to fasting (Ahima et al., 1996). Leptin increases locomotor activity and voluntary running during fed states in leptin-deficient humans (Farooqi et al., 1999; Licinio et al., 2004), ob/ob mice (Morton et al., 2011; Pelkeymounter et al., 1995), wild-type mice (Morton et al., 2011), and rats (Choi et al., 2008; Meek et al., 2012; Morton et al., 2011), or has no effect on running in fed wild-type mice (Morton et al., 2011; Pelkeymounter et al., 1995). In contrast, leptin inhibits locomotor activity and voluntary wheel running when food is limited in ob/ob and lean mice (Morton et al., 2011) and rats (Exner et al., 2000; Verhagen et al., 2011). Physical activity escalates with food restriction, and leptin concentrations are inversely related to running in humans (Franks et al., 2003; Hebebrand et al., 2003), rats (Exner et al., 2000; Hebebrand et al., 2003), wild-type mice (Morton et al., 2011; Thorburn et al., 2000), and in mice bred for high running capacity (Girard et al., 2007).

Furthermore, leptin levels inversely correlate with marathon run-time independent of BMI (Bobbert et al., 2012) and with run speed and duration in high-running mice (Girard et al., 2007), suggesting that leptin impacts the motivational and rewarding effects of running. Indeed, endurance running is rewarding in humans (“runners high”) (Morgan, 1985; Partin, 1983; Wagemaker and Goldstein, 1980) and rodents (Belke and Wagner, 2005; Collier and Hirsch, 1971; Kagan and Berkun, 1954), yet little is known about the neural mechanisms involved. Leptin modulates multiple components of brain reward circuitry (Fulton et al., 2000), and LepR signaling in dopamine (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) is well-documented (Domingos et al., 2011; Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006; Liu et al., 2011). LepR knockdown in the VTA increases food intake and locomotor activity (Hommel et al., 2006) and food-motivated behavior (Davis et al., 2011). LepR signaling includes the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Banks et al., 2000), which is observed in DA and GABA neurons of the VTA (Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006). However, leptin-induced pSTAT3 is found in only a subset of LepR-positive neurons (Scott et al., 2009), suggesting that LepR-STAT3 signaling may have unique neurobehavioral actions. Given the implication of ERK signaling in the anorectic actions of VTA leptin (Trinko et al., 2011), here we tested the hypothesis that STAT3 in DA neurons is involved in the control of physical activity, including voluntary running and the rewarding effects of running.

## **Experimental Procedures**

### **Animals**

Mice in which loxP sites flank exon 22 of the STAT3 gene that encodes a tyrosine residue (tyr705) essential for STAT3 activation were graciously provided by Dr. Shizuo Akira. The truncated STAT3 product does not act as a dominant negative for STAT5 (Takeda et al., 1998). Female mice homozygous for the floxed STAT3 allele were crossed with male mice heterozygous for the floxed STAT3 allele and heterozygous for the DAT::Cre transgene (Baackman et al., 2006). Experiments were carried out in mice 10–14 weeks of age, with the exception of long-term free-feeding, body weight, and wheel running studies that continued beyond this period.

### **Metabolic Assessments**

Intake and body weight were measured three times per week. Lean and fat mass were determined at 23 weeks of age using an Echo MRI. Feed efficiency was calculated by dividing total body weight gain by total food intake (over 16-week period). A Comprehensive Lab Animal Monitoring System ([CLAMS]; Columbus Instruments) was used to measure O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> output, and heat production. Locomotor activity was measured in separate cages (Accuscan Instruments Inc.).

### **Voluntary Wheel Running**

Voluntary wheel running was assessed in a separate cohort of mice that were individually housed in larger cages with continuous access to a low-profile, wireless running wheel (Med Associates, Inc.).

## **Viral-Mediated STAT3 Restoration**

The DIO vector consists of an IRES bicistronic sequence coding for STAT3 and mCherry in the antisense orientation of the human synapsin promoter and flanked by loxP and lox2722 sequences (Virovek, Inc.) (Figure 1J). The functional vector (4.9 kb) was packaged in AAV9 and confers Cre-dependent expression (Figure S3). With bregma and lambda in the same horizontal plane, AAV-DIO-STAT3 ( $2.5 \times 10^9$  GC/500 nl per side) was injected using a Hamilton neurosyringe into bilateral VTA (AP, 3.4 mm; ML,  $\pm 0.4$  mm; DV, 4.9 mm) via a mouse stereotaxic (Kopf). 5 days after the surgery, mice had free access to a running wheel.

## **Intra-Cerebral Cannulations, Feeding, Operant Responding, and Compulsive and Hedonic Feeding**

See Supplemental Experimental Procedures.

### **Running Reward**

Singly housed mice (11–14 weeks of age) had free access to running wheels for 3 weeks and were then subjected to a CPP task using an automated mouse CPP (Figure 3A; Med Associates Inc.).

### **Pre-Test**

Mice were confined to each compartment for 5 min and then allowed to move freely in the apparatus for 15 min.

### **Conditioning Trials**

Mice had 2 hr access either to a running wheel (paired trial) or a locked running wheel (unpaired trial) and were then confined to one of the compartments for 30 min. Paired and unpaired conditioning trials took place in opposite compartments (counterbalanced across mice) on alternating days (Figure 3A).

### **Post-Test**

Following the last day of conditioning (Day 14), mice were placed back in the open CPP apparatus for 15 min. Intra-VTA injection were performed 1 hr prior.

### **Fast-Scan Cyclic Voltammetry**

Fast-scan cyclic voltammetry was used to measure evoked DA overflow according to published procedures (Fulton et al., 2011). Briefly, DA release in the NAc core (+0.90 to +1.30 mm from Bregma) was electrically evoked at 5 min intervals by a single 400 mA, 1.2 ms, rectangular pulse. Electrode potential was linearly scanned from 0.4 to +1.2 V and back to 0.4 V versus Ag/ AgCl using a 400 V/s scan rate. One recording and stimulation site was tested per slice. DA overflow was evoked five to eight times per slice. The mean value of the last three recordings was used for comparisons. The sample size is indicated as  $n = (x;y)$ , x referring to the number of slices and y the number of mice.

## **D1R Agonist, AMPH Sensitization, Immunoblotting, and Real-Time PCR**

See Supplemental Experimental Procedures

### **Statistical Analyses**

Data were analyzed using GraphPad v5 and are presented as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVAs with Bonferonni post hoc tests were used to analyze body weight, food intake, energy expenditure, spontaneous locomotor activity, wheel running, and operant responding. t tests were used for comparisons of body composition, feed efficiency, dark cycle locomotor activity, food intake following leptin injection, daily running distance, compulsive feeding, hedonic feeding, running reward, electrochemistry, immunoblotting, and qPCR experiments.



## **Results**

### **Ablation of STAT3 in DA Neurons**

STAT3 mice in which loxP sites flank exon 22 of the STAT3 gene that encodes tyrosine 705 that is essential for STAT3 activation (Takeda et al., 1998) were bred with mice that express Cre recombinase under the control of the dopamine transporter (DAT). STAT3<sup>fl/fl</sup>;DAT<sup>Cre</sup> mice ("STAT3<sup>DAT KO</sup>") had similar weaning weights (Figure 1A, inset). The recombined STAT3 gene was observed in tissue in which DAT is expressed (Figure S1A) and was specific to DA neurons (Figure S1B).

### **STAT3 in DA Neurons Influences Body Weight and Physical Activity**

STAT3<sup>DAT KO</sup> mice weighed significantly less than controls as of 19 weeks of age (Figure 1A), an effect associated with less fat mass (Figure 1B). Normalized caloric intake was comparable between genotypes (Figure 1C), but feed efficiency was decreased in STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figure 1D) to suggest elevated energy expenditure. Heat dissipation and respiratory exchange were unchanged (Figures 1E and 1F); thus, we next explored if heightened physical activity contributes to greater energy expenditure. Horizontal movement (Figure 1G) and distance traveled in the dark cycle (inset) were elevated in STAT3<sup>DAT KO</sup> mice. We next assessed voluntary wheel running to find that it was substantially increased in STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figure 1H), which ran 11 km/ day as compared to 6 km/day of controls (Figure 1I). Running was similar between DAT<sup>Cre</sup> mice and littermates controls, suggesting that increased running of STAT3<sup>DAT KO</sup> mice is not attributable to Cre transgene alone (Figure S2).

We next rescued STAT3 via VTA microinjections of an adeno-associated virus ("AAV-DIO-STAT3"; Figure 1J). The STAT3 transgene was expressed only in DA neurons (Figures S3A and S3B) and increased STAT3 expression (Figure S3C). AAV-DIO-STAT3 normalized voluntary running of STAT3<sup>DAT KO</sup> to that of controls (Figures 1K and 1L), suggesting that increased running of KO mice is not due to trophic actions associated with leptin. Finally, in view of the link between LepR signaling in DA neurons and anxiety (Liu et al., 2011), we verified anxiety-like behavior. Exploration in the elevated-plus maze and open field was similar between genotypes (Figures S4A–S4D). Thus, loss of STAT3 in DA neurons enhances spontaneous activity and endurance running in a manner unrelated to anxiety, results that coincide with observations that VTA leptin inhibits wheel running in a rat model of anorexia-induced hyperactivity (Verhagen et al., 2011). Hyperactivity and motor restlessness is a detrimental clinical feature of anorexia nervosa that has been tied to hypoleptinemia (Hebebrand et al., 2003; Holtkamp et al., 2003), and thus these findings have implications for understanding anorexia-induced hyperactivity.

## **STAT3 in DA Neurons Does Not Modulate Feeding Behavior**

We next ascertained if STAT3 signaling in DA neurons mediates the anorectic effects of central leptin. Decreases in food intake following intra-VTA leptin were not different between control and STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figure 2A). Likewise, reductions in food intake following ICV injection of leptin were similar (Figure 2B), suggesting that LepR-STAT3 signaling in DA neurons has a minimal impact on the anorectic actions of leptin. We then employed an operant task to determine the role of STAT3 signaling

in DA neurons in food-motivated behavior.  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$  mice exhibited significant response impairments as evidenced by reduced lever presses (Figure 2C) and increased percentage of incorrect responses (Figure 2D). Elevated incorrect responses could reflect a compulsive phenotype. To address this possibility, we performed a conditioned suppression test to evaluate sucrose intake in the context of aversive conditioning. Sucrose intake was similarly suppressed across groups implying that  $\text{STAT3}^{\text{DAT KO}}$  mice are not compulsive eaters (Figure 2E). As a final approach, we employed a hedonic feeding test whereby sated mice overeat palatable food (Choi et al., 2010). Caloric intake increased to a similar extent in both groups when exposed to the sweetened, high-fat food (dessert) (Figure 2F).

## **Leptin Inhibits the Rewarding Effects of Running through STAT3 in DA Neurons**

Endurance running or exercise can promote a lasting sense of well-being that includes feelings of euphoria and pleasantness commonly referred to as the runner's high (Morgan, 1985; Partin, 1983; Wagemaker and Goldstein, 1980). Running also has rewarding properties in rodents: rats will work to gain access to a running wheel (Pierce et al., 1986) and spend more time in a place associated with the after effects of wheel running (Lett et al., 2000). Addictive and compulsive-like behaviors directed at high levels of physical activity are reported in humans (Davis et al., 1995) and rodents (Werme et al., 1999). Running engages opioid (Lett et al., 2002; Vargas-Pérez et al., 2004), DA (de Castro and Hill, 1988; Greenwood et al., 2011; Mathes et al., 2010; Vargas-Pérez et al., 2004) and endocannabinoid (eCB) systems

(Dubreucq et al., 2013). Using a conditioned place preference (CPP) task (Figure 3A), we found that the rewarding effect of running is increased in KO mice: STAT3<sup>DAT KO</sup> mice spend more time in the paired side of the chamber associated with running (Figures 3B and 3C). Next, a separate cohort of mice received either intra-VTA saline or leptin at a dose shown to inhibit feeding (Figure 2A) prior to CPP testing. STAT3<sup>DAT KO</sup> mice treated with vehicle again displayed increased running reward (Figure 3D). VTA leptin completely suppressed the rewarding effects of running in controls yet was unable to block running reward in STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figure 3E).

## **Lack of STAT3 Blunts DA Overflow and Mesolimbic Function and Alters Opioid Markers**

The NAc is strongly innervated by VTA DA neurons, and leptin deficiency reduces NAc DA overflow and TH, the rate-limiting enzyme for DA biosynthesis (Fulton et al., 2006). We used fast scan cyclic voltammetry (Figure 4A), a real-time electrochemical method, to measure axonal DA overflow in the NAc core sub compartment that has been linked to the control of wheel running (Greenwood et al., 2011; Vargas-Perez et al., 2003). Evoked DA overflow was significantly diminished in STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figures 4B and 4C). In addition, TH and D1 receptor expression were decreased in the NAc of STAT3<sup>DAT KO</sup> mice (Figure 4D), similar to findings in mice bred for high-running capacity (Knab et al., 2009). We next assessed the locomotor-stimulating effects of a DA D1 receptor agonist and locomotor sensitization in response to amphetamine (AMPH). STAT3<sup>DAT KO</sup> mice displayed decreased locomotion in response to D1 receptor agonism (Figures 4E and 4F) and failed to

sensitize to AMPH (Figures 4G and 4H). Reduced DA overflow in the NAc is reported in conditions of increased food reward, including diet-induced obesity (Geiger et al., 2008) and leptin deficiency (Fulton et al., 2006). Similarly, blunted responses to AMPH and compromised striatal DA signaling are tied to enhanced reward seeking in humans (Casey et al., 2014; Stice et al., 2008). As a final measure, we measured the expression of several opioid and eCB markers in the VTA and NAc.  $STAT3^{DAT KO}$  mice exhibited a near-significant increase in delta opioid receptor (DOR) mRNA levels in the NAc (Figure 4I). Higher DOR levels could amplify opioid signaling to increase running reward. Consistent with increased opioid tone during the runner's high, elevated dynorphin mRNA levels in the NAc core have been observed in a high-running rat strain (Werme et al., 1999), a trend observed for pre-prodynorphin mRNA in  $STAT3^{DAT KO}$  mice (Figure 4I). In contrast, pre-prodynorphin mRNA was attenuated in the VTA of  $STAT3^{DAT KO}$  mice (Figure 4J). While eCBs themselves were not measured, no changes were found in any eCB-related molecules.

## **Discussion**

The present study reveals leptin as an important signal controlling the rewarding impact of running and identifies a key role for STAT3 signaling in DA neurons in this process. STAT3 deletion led to substantial increases in spontaneous activity and endurance running, whereas targeted viral-mediated restoration of STAT3 reversed this effect. STAT3 loss-of-function had little influence on the anorectic actions of leptin, hedonic, or compulsive feeding behavior, results that highlight the specific involvement of STAT3 signaling in DA neurons in the control of physical activity. By tying behavioral changes to decreases in DA over flow and reduced mesolimbic function, the results underscore STAT3 as an important regulator of mesolimbic DA tone, physical activity, and the motivational effects of running. Few studies have investigated the mechanisms underlying the effects of leptin on physical activity. The hypoactivity of obese, LepR-deficient mice is corrected by restoration of LepR to the mediobasal hypothalamus (Coppari et al., 2005) or pro-opiomelanocortin neurons (Huo et al., 2009), underscoring the role of the hypothalamus in the actions of leptin to stimulate locomotor behavior. However, leptin suppression of physical activity when food is limited suggests the presence of distinct neural mechanisms. We speculate that in conditions of restricted food availability the mesolimbic DA system engages motivational processes concerned with obtaining food and more readily responds to leptin to decrease appetitive physical activity. On the other hand, during fed states, the actions of leptin may be biased toward hypothalamic processes that could increase physical activity as a means to maintain energy homeostasis. Our

results point to reduced LepR-STAT3 signaling in midbrain DA neurons as an important mechanism mediating increased physical activity by food restriction and falling leptin levels. Consideration must be given to the fact that signals other than leptin activate STAT3, and thus we cannot rule out that the behavioral and biochemical effects observed could be independent of leptin. Our findings that VTA leptin decreases the rewarding effects of running in a STAT3-dependent manner suggest that leptin is involved; however, the concentrations of leptin administered may not represent physiological levels found in the VTA. In spite of this, a previous study noted that phosphorylation of STAT3 at Tyr705 was not evident in the VTA of LepR-deficient mice (Fulton et al., 2006) to suggest that other signals (e.g., interleukin-6) are not activating STAT3 in DA neurons in basal conditions. While heightened physical activity during food restriction seems paradoxical to the maintenance of energy reserves, it is considered an expression of increased food acquisition behaviors (Bartness et al., 2011; Overton and Williams, 2004). The capacity for endurance running in cursorial mammals is considered to enable food attainment when it is distant or requires pursuit (examples of distance hunters in Carrier, 1984). Correspondingly, the runner's high may have evolved to encourage stamina and thereby increase the probability of return on this energetic investment. The motivational effects of physical activity would presumably rise during conditions when food is scarce or costly to promote hunting, scavenging, or food hoarding, and decrease as a function of food availability and increasing leptin. Interestingly, food hoarding increases with food restriction (Cabanac and Swiergiel, 1989), is attenuated by leptin (Buckley and Schneider, 2003; Keen-Rhinehart and Bartness, 2008), and

was surmised to underlie a reward circuit inhibited by leptin (Fulton et al., 2000). In conditions where food is abundant and easy to access, the runner's high could prove beneficial for encouraging physical activity. It is compelling that chronic, but not acute, exercise lowers leptin levels in men (Pe'russe et al., 1997), and so endurance training could be intrinsically rewarding by moderating LepR-STAT3 signaling in DA neurons. The rewarding properties of physical activity can foster excessive exercise and compulsive behavior characteristic of addiction in some individuals. Intriguingly, a recent report shows that exercise addiction in men is associated with low, fat-adjusted leptin levels (Lichtenstein et al., 2014). It remains to be elucidated if genetic or physiological factors could contribute to a larger drop in leptin or enhanced LepR sensitivity in response to food restriction or exercise during normal or pathological (e.g., anorexia) states that would increase the propensity for physical activity. In view of its well-established role in motivation, the contribution of DA in the control of running reward is not surprising. It is unclear how STAT3 signaling modulates DA tone; however, the DAT promoter contains a STAT3 binding sequence that may be pertinent. Previous investigations implicate opioids in the runner's high (Boecker et al., 2008) and VTA eCB signaling that modulate DA release in running performance of mice (Dubreucq et al., 2013). DA, opioid, and eCB systems converge in basal ganglia circuitry, and several studies highlight their interaction in the control of drug and food reward (Fulton, 2010). The present study provides some evidence of DA-opioid interactions in the NAc that may contribute to heightened running reward. Undoubtedly, considerable additional work is needed to parcel out the precise



contribution of DA, opioid and eCB signals and the manner by which they interact to impact physical activity and its rewarding effects.

## **Contributions**

MFF performed the feeding, metabolic, operant, CPP, anxiety and immunoblotting experiments. DM performed the AAV-Flex, conditioned suppression experiments, D1 agonist and CLAMS experiments, CH performed the qPCR and SS contributed to setting up and analysing the operant and anxiety behavioral experiments. SM helped with colony management and performed PCR. S.F. carried out the cyclic voltammetry experiments. MFF and SF prepared the manuscript. TA helped with plasmid and AAV design and results interpretation.

## **Acknowledgements**

The authors thank Ralph DiLeone, Jeffrey Flier and Marc Prentki for very helpful comments on earlier versions of this manuscript. We are grateful to Shizuo Akira for providing us with the STAT3-floxed mice. We also thank Louis-Eric Trudeau, Rafael Varaschin Koerich and Marie- Josée Bourque for access and help with voltammetry equipment. This work is supported by an operating grant and New Investigator award to SF from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-123280), an FRQS Salary award to TA, a doctoral fellowship to MFF from the Canadian Diabetes Association and a scholarship to DM from the Department of Neuroscience, University of Montreal.

## **References**

- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250–252.
- Backman, C.M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B.J., Westphal, H., and Tomac, A.C. (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis* 44, 383–390.
- Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., and Myers, M.G., Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14563–14572.
- Bartness, T.J., Keen-Rhinehart, E., Dailey, M.J., and Teubner, B.J. (2011). Neural and hormonal control of food hoarding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R641–R655.
- Belke, T.W., and Wagner, J.P. (2005). The reinforcing property and the rewarding aftereffect of wheel running in rats: a combination of two paradigms. *Behav. Processes* 68, 165–172.
- Bobbert, T., Mai, K., Brechtel, L., Schulte, H.M., Weger, B., Pfeiffer, A.F., Spranger, J., and Diederich, S. (2012). Leptin and endocrine parameters in marathon runners. *Int. J. Sports Med.* 33, 244–248.
- Boecker, H., Sprenger, T., Spilker, M.E., Henriksen, G., Koppenhoefer, M., Wagner, K.J., Valet, M., Berthele, A., and Tolle, T.R. (2008). The runner's high: opioidergic mechanisms in the human brain. *Cereb. Cortex* 18, 2523–2531.
- Bramble, D.M., and Lieberman, D.E. (2004). Endurance running and the evolution of *Homo*. *Nature* 432, 345–352.
- Buckley, C.A., and Schneider, J.E. (2003). Food hoarding is increased by food deprivation and decreased by leptin treatment in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1021–R1029.
- Cabanac, M., and Swiergiel, A.H. (1989). Rats eating and hoarding as a function of body weight and cost of foraging. *Am. J. Physiol.* 257, R952–R957.
- Carrier, D.R. (1984). The energetic paradox of human running and hominid evolution. *Curr. Anthropol.* 25, 483–495.
- Casey, K.F., Benkelfat, C., Cherkasova, M.V., Baker, G.B., Dagher, A., and Leyton, M. (2014). Reduced dopamine response to amphetamine in subjects at ultra-high risk for addiction. *Biol. Psychiatry* 76, 23–30.

Choi, Y.H., Li, C., Hartzell, D.L., Little, D.E., Della-Fera, M.A., and Baile, C.A. (2008). ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 188, 100–108.

Choi, D.L., Davis, J.F., Fitzgerald, M.E., and Benoit, S.C. (2010). The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 167, 11–20.

Collier, G., and Hirsch, E. (1971). Reinforcing properties of spontaneous activity in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 77, 155–160.

Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., Jr., et al. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* 1, 63–72.

Davis, C., Kennedy, S.H., Ralevski, E., Dionne, M., Brewer, H., Neitzert, C., and Ratusny, D. (1995). Obsessive compulsiveness and physical activity in anorexia nervosa and high-level exercising. *J. Psychosom. Res.* 39, 967–976.

Davis, J.F., Choi, D.L., Schurdak, J.D., Fitzgerald, M.F., Clegg, D.J., Lipton, J.W., Figlewicz, D.P., and Benoit, S.C. (2011). Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol. Psychiatry* 69, 668–674.

de Castro, J.M., and Hill, J.O. (1988). Exercise and brain catecholamine relationships with brown adipose tissue and whole-body oxygen consumption in rats. *Physiol. Behav.* 43, 9–12.

Domingos, A.I., Vaynshteyn, J., Voss, H.U., Ren, X., Gradinaru, V., Zang, F., Deisseroth, K., de Araujo, I.E., and Friedman, J. (2011). Leptin regulates the reward value of nutrient. *Nat. Neurosci.* 14, 1562–1568.

Dubreucq, S., Durand, A., Matias, I., Be´nard, G., Richard, E., Soria-Gomez, E., Glangetas, C., Groc, L., Wadleigh, A., Massa, F., et al. (2013). Ventral tegmental area cannabinoid type-1 receptors control voluntary exercise performance. *Biol. Psychiatry* 73, 895–903.

Exner, C., Hebebrand, J., Renschmidt, H., Wewetzer, C., Ziegler, A., Herpertz, S., Schweiger, U., Blum, W.F., Preibisch, G., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2000). Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 5, 476–481.

Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., and O'Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–884.

Franks, P.W., Farooqi, I.S., Luan, J., Wong, M.Y., Halsall, I., O'Rahilly, S., and Wareham, N.J. (2003). Does physical activity energy expenditure explain the

between-individual variation in plasma leptin concentrations after adjusting for differences in body composition? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3258– 3263.

Fulton, S. (2010). Appetite and reward. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 85–103. Fulton, S., Woodside, B., and Shizgal, P. (2000). Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science* 287, 125–128.

Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2006). Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51, 811–822.

Fulton, S., Thibault, D., Mendez, J.A., Lahaie, N., Tirotta, E., Borrelli, E., Bouvier, M., Tempel, B.L., and Trudeau, L.E. (2011). Contribution of Kv1.2 voltage-gated potassium channel to D2 autoreceptor regulation of axonal dopamine overflow. *J. Biol. Chem.* 286, 9360–9372.

Geiger, B.M., Behr, G.G., Frank, L.E., Caldera-Siu, A.D., Beinfeld, M.C., Kokkotou, E.G., and Pothos, E.N. (2008). Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB J.* 22, 2740–2746.

Girard, I., Rezende, E.L., and Garland, T., Jr. (2007). Leptin levels and body composition of mice selectively bred for high voluntary locomotor activity. *Physiol. Biochem. Zool.* 80, 568–579.

Greenwood, B.N., Foley, T.E., Le, T.V., Strong, P.V., Loughridge, A.B., Day, H.E., and Fleshner, M. (2011). Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behav. Brain Res.* 217, 354–362.

Hebebrand, J., Exner, C., Hebebrand, K., Holtkamp, C., Casper, R.C., Remschmidt, H., Herpertz-Dahlmann, B., and Klingenspor, M. (2003). Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiol. Behav.* 79, 25–37.

Holtkamp, K., Herpertz-Dahlmann, B., Mika, C., Heer, M., Heussen, N., Fichter, M., Herpertz, S., Senf, W., Blum, W.F., Schweiger, U., et al. (2003). Elevated physical activity and low leptin levels co-occur in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5169–5174.

Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.W., Gao, X.B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., and DiLeone, R.J. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51, 801–810.

Huo, L., Gamber, K., Greeley, S., Silva, J., Huntoon, N., Leng, X.H., and Bjørbaek, C. (2009). Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. *Cell Metab.* 9, 537–547.

Kagan, J., and Berkun, M. (1954). The reward value of running activity. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 108. Keen-Rhinehart, E., and Bartness, T.J. (2008). Leptin

inhibits food-deprivation-induced increases in food intake and food hoarding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1737–R1746.

Knab, A.M., Bowen, R.S., Hamilton, A.T., Gullledge, A.A., and Lightfoot, J.T. (2009). Altered dopaminergic profiles: implications for the regulation of voluntary physical activity. *Behav. Brain Res.* 204, 147–152.

Lett, B.T., Grant, V.L., Byrne, M.J., and Koh, M.T. (2000). Pairings of a distinctive chamber with the aftereffect of wheel running produce conditioned place preference. *Appetite* 34, 87–94.

Lett, B.T., Grant, V.L., Koh, M.T., and Flynn, G. (2002). Prior experience with wheel running produces cross-tolerance to the rewarding effect of morphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 101–105.

Lichtenstein, M.B., Andries, A., Hansen, S., Frystyk, J., and Stoving, R.K. (2014). Exercise Addiction in Men Is Associated With Lower Fat-Adjusted Leptin Levels. *Clin. J. Sport Med.* 25, 138–143.

Licinio, J., Caglayan, S., Ozata, M., Yildiz, B.O., de Miranda, P.B., O’Kirwan, F., Whitby, R., Liang, L., Cohen, P., Bhasin, S., et al. (2004). Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4531–4536.

Liu, J., Perez, S.M., Zhang, W., Lodge, D.J., and Lu, X.Y. (2011). Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increases dopaminergic activity in amygdala. *Mol. Psychiatry* 16, 1024–1038.

Mathes, W.F., Nehrenberg, D.L., Gordon, R., Hua, K., Garland, T., Jr., and Pomp, D. (2010). Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. *Behav. Brain Res.* 210, 155–163.

Meek, T.H., Dlugosz, E.M., Vu, K.T., and Garland, T., Jr. (2012). Effects of leptin treatment and Western diet on wheel running in selectively bred high runner mice. *Physiol. Behav.* 106, 252–258.

Morgan, W.P. (1985). Affective beneficence of vigorous physical activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 17, 94–100.

Morton, G.J., Kaiyala, K.J., Fisher, J.D., Ogimoto, K., Schwartz, M.W., and Wisse, B.E. (2011). Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E392–E401.

Overton, J.M., and Williams, T.D. (2004). Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiol. Behav.* 81, 749–754.

Partin, C. (1983). Runner’s “high”. *JAMA* 249, 21.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540–543.

Pérusse, L., Collier, G., Gagnon, J., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Nadeau, A., Zimmet, P.Z., and Bouchard, C. (1997). Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J. Appl. Physiol.* 83, 5–10.

Pierce, W.D., Epling, W.F., and Boer, D.P. (1986). Deprivation and satiation: The interrelations between food and wheel running. *J. Exp. Anal. Behav.* 46, 199–210.

Scott, M.M., Lachey, J.L., Sternson, S.M., Lee, C.E., Elias, C.F., Friedman, J.M., and Elmquist, J.K. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 514, 518–532.

Stice, E., Spoor, S., Bohon, C., and Small, D.M. (2008). Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by Taq1A A1 allele. *Science* 322, 449–452.

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., and Akira, S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* 161, 4652–4660.

Thorburn, A.W., Holdsworth, A., Proietto, J., and Morahan, G. (2000). Differential and genetically separable associations of leptin with obesity-related traits. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24, 742–750.

Trinko, R., Gan, G., Gao, X.B., Sears, R.M., Guarnieri, D.J., and DiLeone, R.J. (2011). Erk1/2 mediates leptin receptor signaling in the ventral tegmental area. *PLoS One* 6, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027180>.

Vargas-Perez, H., Mena-Segovia, J., Giordano, M., and Díaz, J.L. (2003). Induction of c-fos in nucleus accumbens in naive male Balb/c mice after wheel running. *Neurosci. Lett.* 352, 81–84.

Vargas-Perez, H., Borrelli, E., and Diaz, J.L. (2004). Wheel running use in dopamine D2L receptor knockout mice. *Neurosci. Lett.* 366, 172–175.

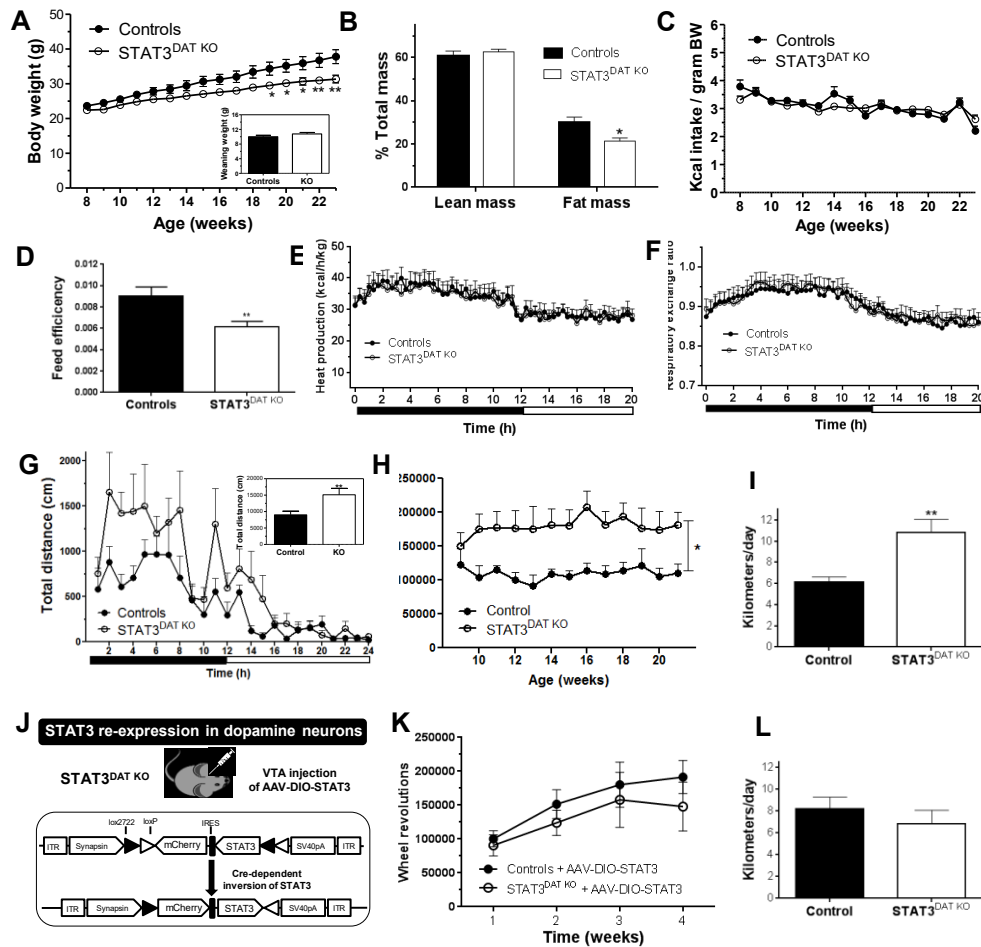
Verhagen, L.A., Luijendijk, M.C., and Adan, R.A. (2011). Leptin reduces hyperactivity in an animal model for anorexia nervosa via the ventral tegmental area. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 274–281.

Wagemaker, H., and Goldstein, L. (1980). The runner's high. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 20, 227–229.

Werme, M., Thoren, P., Olson, L., and Brené, S. (1999). Addiction-prone Lewis but not Fischer rats develop compulsive running that coincides with downregulation of nerve growth factor inducible-B and neuron-derived orphan receptor 1. *J. Neurosci.* 19, 6169–6174.

## Tables and figures

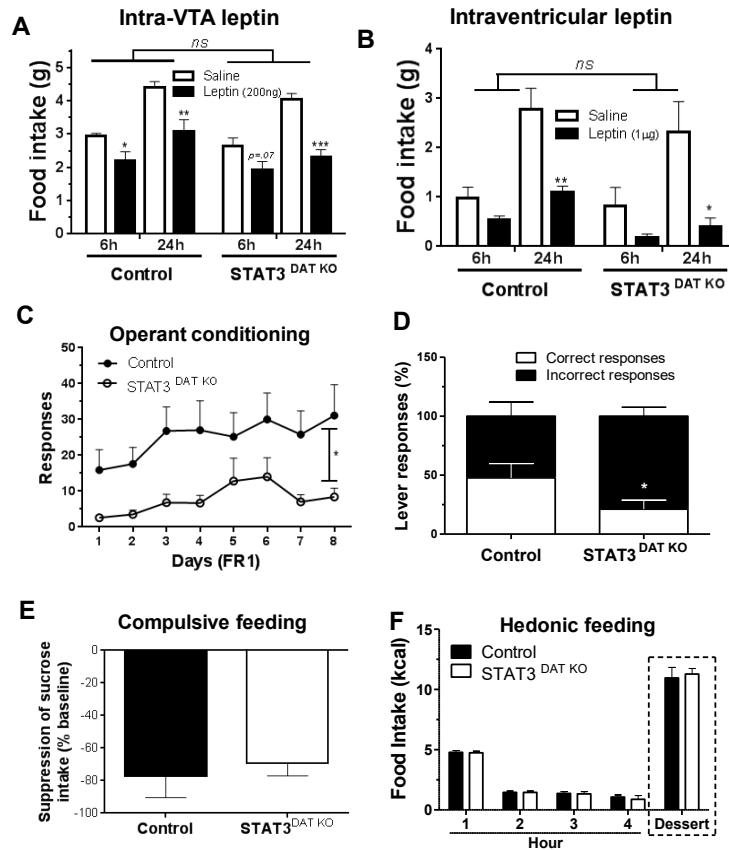
Figure 1



**Figure 1: STAT3 in DA Neurons Controls Body Weight, Locomotor Activity, and Voluntary Running** (A) Body weights (n = 8/group). Inset: weaning weights (n = 20/group). (B) Lean and fat mass at 23 weeks of age (n = 7 to 8/group). (C) Caloric intake normalized to body weight (n = 7 to 8/group). (D) Feed efficiency (total weight gain/total intake; n = 7 to 8/group). (E) Heat production as measured by indirect calorimetry (n = 14–16 per group). Dark cycle denoted by horizontal black bar. (F) Respiratory exchange (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) (n = 14–16/group). (G) 24 hr ambulatory activity (n = 9/group) (\*p % 0.05; main effect). Inset: dark phase activity. (H) Voluntary wheel running (n = 6 to 7/group). (I) Daily running distance (n = 7–12). (J) Viral strategy used to restore STAT3 selectively in DA neurons of STAT3<sup>DAT KO</sup> mice. (K and L) Rescuing STAT3 normalizes the voluntary wheel running of STAT3<sup>DAT KO</sup> mice to that of controls. n = 6 to 7/group. \*p % 0.05; \*\* p % 0.01; \*\*\*p < 0.001.

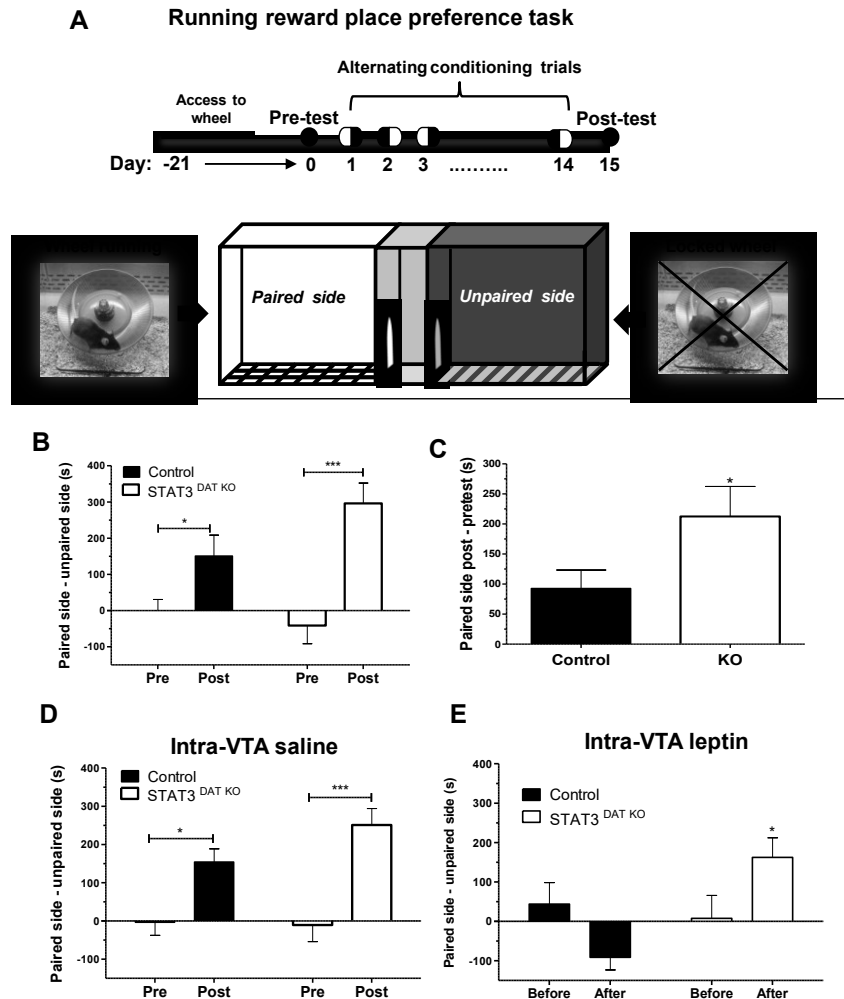


**Figure 2**



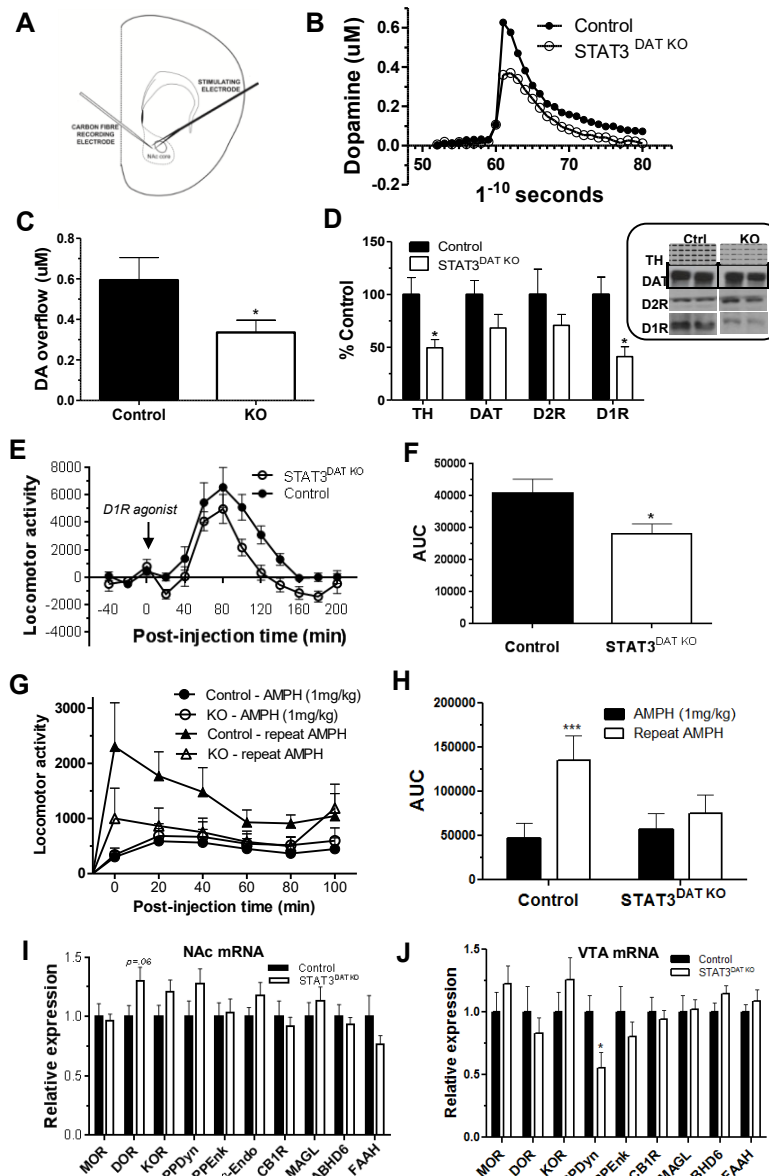
**Figure 2. STAT3 in DA Neurons Fails to Modulate the Anorectic Effects of Leptin and Compulsive and Hedonic Feeding** (A) Food intake of control and STAT3DAT KO mice receiving an intra-VTA injection of leptin (200 ng) or vehicle ( $n = 7-11/\text{group}$ ). (B) Food intake following ICV injection of leptin (1 mg) or vehicle ( $n = 4/\text{group}$ ). (C) Lever press responses in a fixed-ratio (FR)-1 operant task ( $n = 9/\text{group}$ ; main effect of genotype). (D) Correct/incorrect responses by day 8 of testing ( $n = 9/\text{group}$ ). (E) Suppression of sucrose intake in a conditioned suppression test of compulsive eating ( $n = 7/\text{group}$ ). (F) Intake of sweetened, high-fat “dessert” ( $n = 7/\text{group}$ ). \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 3**



**Figure 3. Intra-VTA Leptin Blocks the Rewarding Effects of Running in a STAT3-Dependent Manner** (A) CPP task. Alternating conditioning trials (paired one day, unpaired next) lasted 14 days. (B) All mice showed significant preference for the “paired” side of the chamber associated with running ( $n = 12\text{--}16/\text{group}$ ). (C) Preference for the paired side of the chamber is enhanced in STAT3DAT KO mice. (D) In a separate cohort, running CPP was assessed after intra-VTA injection of vehicle ( $n = 8$  to  $9/\text{group}$ ). As in (B), STAT3DAT KO mice show increased running CPP. (E) Intra-VTA leptin (200 ng, 500  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) blocked the rewarding effects of running in control but not in STAT3DAT KO mice ( $n = 10$  to  $11/\text{group}$ ). \* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figure 4**

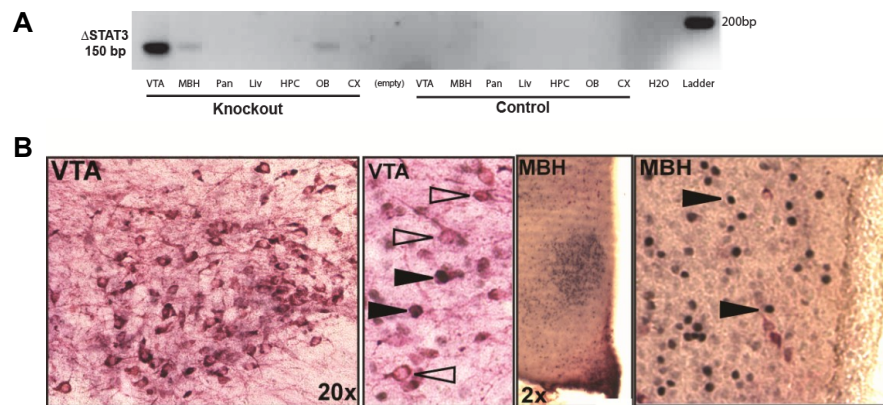


**Figure 4. Lack of STAT3 in DA Neurons Decreases Nucleus Accumbens DA Overflow, Blunts Mesolimbic DA Function, and Alters Opioid Markers** (A) Slice preparation for cyclic voltammetry. (B) Current-time plot showing subsecond stimulation-evoked DA release and reuptake. Oxidation current peaks for DA were obtained at potentials of 300 to 500 mV (versus Ag/AgCl) corresponding to 3.5–4.5 ms in the voltage waveform. (C) NAc DA overflow (mean of peak values from current-time plots) (n = 6; 3/group). (D) DA-related protein expression in the NAc (n = 5–10/group). Normalized to GAPDH. (E and F) Locomotor activity in response to a D1 receptor agonist (0.1 mg/kg) (n = 6 to 7/group; main effect in [E]). (G and H) AMPH locomotor sensitization. (I and J) (I) mRNA expression of opioid and eCB markers in the NAc and (J) VTA. ABHD6: alpha-betadomain-hydrolase 6; bendo: beta-endorphin; CB1: cannabinoid receptor-1; DOR: delta-opioid receptor; FAAH: fatty acid amide hydrolase; KOR: kappaopioid receptor; MAGL: monoacylglycerol lipase; MOR:mu opioid receptor; PPdyn: pre-prodynorphin; pre-proenkephalin (n = 8/group). \*p % 0.05.

## Supplemental information

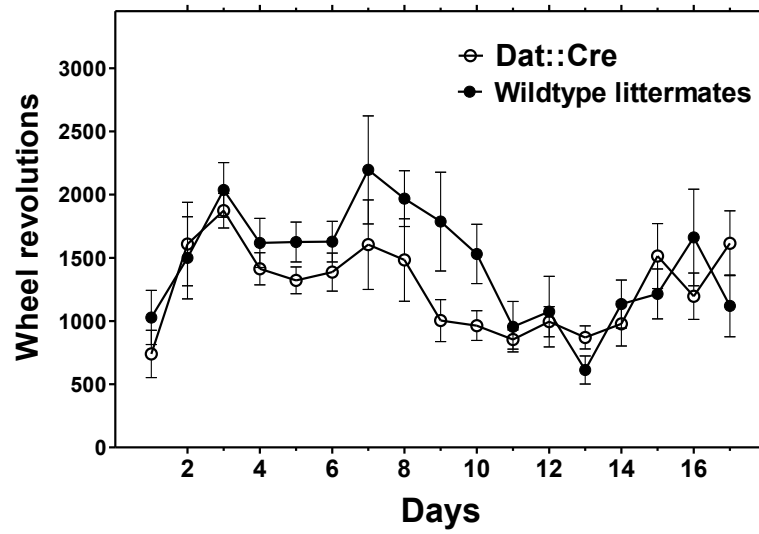
### Supplemental Data

Figure S1



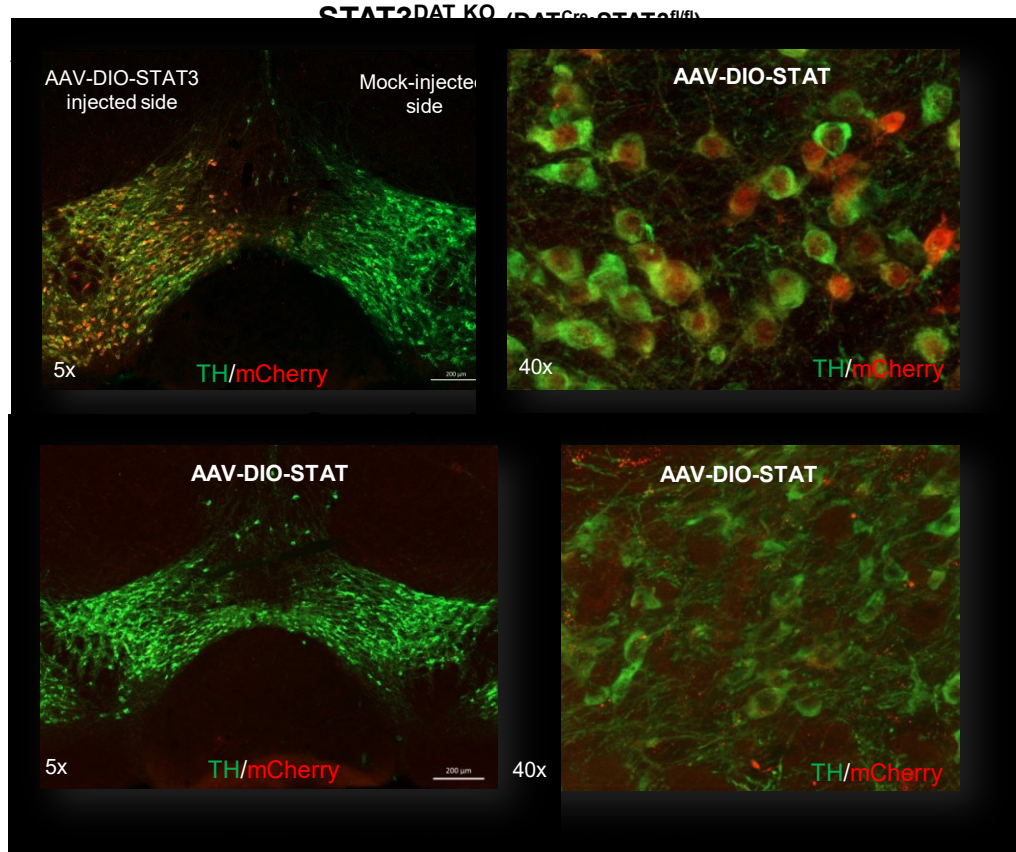
**Figure S1** (related to Figure 1). **(A)** PCR detection of STAT3 gene recombination. CX: cortex; HPC: hippocampus; Liv: liver; MBH: mediobasal hypothalamus; Pan: pancreas; OB: olfactory bulb; VTA: ventral tegmental area; SN: substantia nigra. **(B)** Double immunohistochemistry for TH (VIP, purple) and pStat3( Tyr705) (ni-DAB, black) from leptin treated STAT3<sup>ΔTyr705</sup> mice (n=4/group) reveals the absence of pStat3 from TH<sup>+</sup> (dopamine) neurons (open arrows) and the presence of pStat3 in TH<sup>-</sup> cells (closed arrows) of the VTA and MBH of STAT3<sup>ΔTyr705</sup> mice.

**Figure S2**



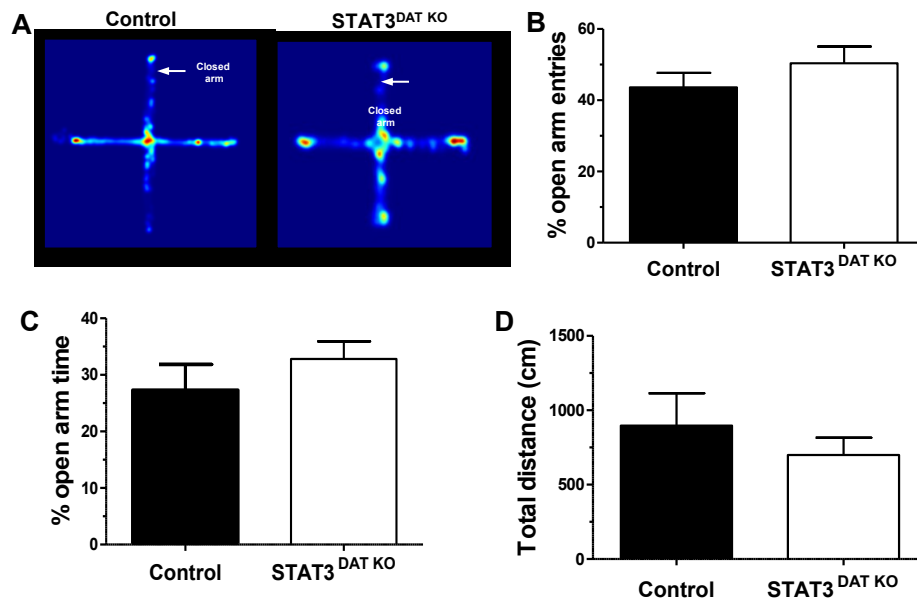
**Figure S2** (related to Figure 1). Similar wheel running activity between DAT::Cre and wildtype littermates (n=4-5/group).

**Figure S3**



**Figure S3** (related to Figure 1). **A.** Coronal slices of the VTA stained with anti-TH (green) and anti-dsRed (mCherry) from *STAT3<sup>DAT KO</sup>* mice injected with AAV-DIO-STAT3 (AAV9-hSyn-FLEX-rev-mSTAT3-IRES-mCherry) reveal selective expression of mCherry in TH<sup>+</sup> (dopamine) neurons of the VTA. 5x image shows mCherry staining on AAV-DIO-STAT3 injected side. All mCherry<sup>+</sup> cells were co-localized with TH. **B.** Control mice injected with the same virus exhibit no mCherry expression. **C.** STAT3 mRNA expression in the VTA of *STAT3<sup>DAT KO</sup>* and control mice injected with AAV-DIO-STAT3 used in wheel running studies (n=5-6 per group).

**Figure S4**



**Figure S4 (related to Figure 1).** (A) Heat maps showing similar exploration of open and closed arms of the EPM in a STAT3<sup>DAT KO</sup> mouse and controls. (B,C) Anxiety-like behavior as measured in the EPM was similar between STAT3<sup>DAT KO</sup> mice and controls (n=11-12/group). Open arm entries (B) and time (C) were not different between genotypes. (D) No differences in exploratory activity were observed in the open field test (n= 5-6/group). Mean ± SEM

## **Supplemental Methods**

### **Cre-mediated recombination**

Genomic DNA (200ng) was isolated from brain tissue punches and peripheral tissue dissections of STAT3DAT KO mice and controls using Trizol and subjected to PCR to detect recombination (“ $\Delta$ STAT3”) (Takeda et al., 1998) using the following primers: a- 5'-CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC-3' (specific for exon 23 of the STAT3 gene) b- 5'-GAT TTG AGT CAG GGA TCC ATA ACT TCG -3' (specific for loxP site upstream of the targeting construct).

### **Immunohistochemistry**

STAT3DAT KO mice and controls were intraperitoneally (IP) injected with either leptin (5 mg/kg body weight) or PBS following an overnight fast. Recombinant leptin was obtained from Dr. A.F. Parlow (National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive Kidney Diseases, Torrance, California). Two hours after treatment, mice were anesthetised with sodium pentobarbital (50mg/kg, IP) and perfused transcardially with 0.9% ice-cold saline followed by 10% neutral buffered formalin. Tissue preparation for pSTAT3 staining was as described (Fulton et al., 2006). Following pSTAT3 primary antibody labeling, sections were rinsed and incubated with a secondary biotinylated anti-rabbit antibody (1:1000; Vector Laboratories), labeled with avidin-biotin complex, and then stained with nickel-enhanced diaminobenzidine (DAB). Floating sections were blocked in avidin/biotin solution followed by 3% goat serum, and then incubated in anti-TH antibody (1:1000,



mouse, Millipore, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) overnight at 4°C. Sections were rinsed and incubated with a secondary biotinylated anti-mouse antibody (1:300; Vector Laboratories), labeled with avidin-biotin complex, and then stained with Vector-VIP substrate. In a separate series of slices (n=4/group) stained for pSTAT3 alone as above, the number of pSTAT3+ cells were counted using ImageJ software in slices at coronal levels corresponding to plates 59 to 61 of the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2004).

For verification of Cre-dependent viral-mediated gene transfer in mice injected with AAV-DIOSTAT3, separate STAT3DAT KO mice and controls were perfused as above. Brains were extracted and post-fixed for 4 hours and then transferred to 20% sucrose overnight at 4°C. Coronal slices (25µm) were washed in PBS, blocked in normal goat serum and incubated with anti-dsRed (1:1000; rabbit polyclonal; Rockland, Inc. PA, USA) and anti-TH (1:1000, mouse monoclonal Millipore, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Slices were then incubated for 2 hours at room temperature with secondary AlexaFluor antibodies 488 (for TH) and 568 for dsRed. Slices were wet-mounted and coverslipped with DAPI mounting media (Vectashield) and visualized with Zeiss fluorescent microscope with Apotome.

## **Wheel running of Cre only controls**

Voluntary wheel running was measured in DAT::Cre mice and wildtype littermates 11-12 weeks of age that were individually housed with a running wheel in the home cage as described in the text.

## **Elevated-plus maze test**

The EPM apparatus consists of two closed arms that oppose two open arms in a plus design (Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA). Decreased time spent in the open, exposed arm is an indicator of increased anxiety-like behavior. The apparatus is placed 60 cm above the floor and has a video camera fixed overhead. Each mouse was placed in the middle of the maze facing the open arm opposing the experimenter. Movement in the maze was recorded and tracked for 5 min by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software (Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA).

## **Open field test**

As an additional test of anxiety-like behavior, STAT3 DAT KO mice and controls were tested in the open field test. The open field consists of a Plexiglas box (50 x 50 x 30 cm) in a lit room. Each mouse was placed in the middle of the novel arena and allowed to explore the field for 5 min. Movement in the field was recorded and tracked by an overhead video camera connected to a PC with Ethovision XT software (Med Associates, Inc., St Albans, VT, USA).

## **Intra-cerebral cannulations and food intake**

Stereotaxic surgeries were performed as described in the text: For VTA cannula implants, a bilateral guide cannula (26 gauge; 0.8mm distance between cannulae; Plastics One, Roanoke, VA, USA) was lowered in the VTA (AP, -3.4 mm; ML,  $\pm$  0.4 mm; DV, -4.7 mm). Intracerebroventricular (ICV) cannula implantation: A

single guide cannula (26 gauge; Plastics One, Roanoke, VA, USA) was lowered into the right lateral ventricle (AP, -0.5 mm; ML,  $\pm$  1 mm; DV, -2 mm). Cannulae were anchored to the skull surface with dental cement and occluded with obturators of the same length. ICV cannula placements were assessed by verifying the drinking response to injection of angiotensin II (10ng/1 $\mu$ l). Mice were habituated to a powder chow diet for 3 days for food intake measures. Powder food was placed in food cups that were fixed to the bottom of a larger container. Following an overnight fast, separate groups of mice received a bilateral VTA injection of leptin (200ng/500nl/side) or vehicle (PBS) via an internal cannula that surpassed the cannulae by 0.2mm or an ICV injection of leptin (1ug/1 $\mu$ l; recombinant mouse leptin from Dr. A.F. Parlow, NIDDK) or vehicle right before dark cycle onset using internal cannulas attached to 1 $\mu$ l Hamilton microsyringe.

## **Operant responding for food**

Mice were trained to press a lever for sucrose pellets according to published procedures (Sharma et al., 2012). As described, mice were mildly food restricted during FR1 training.

## **Hedonic feeding – “Dessert test”**

Mice were entrained over 19 consecutive days to consume standard chow in a 4-hour window in the first half of dark cycle. Prior to the test day (Day 20) all mice were exposed to a small amount of high-fat/sugar food (D12231; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) to prevent neophobia. On the day of testing, chow intake

was measured each hour during 4 hours. Following the fourth hour of chow access, a separate set of food cups containing high-fat/sugar food were placed in each cage and weighed one hour later.

## **Conditioned suppression test**

We implemented a conditioned suppression protocol based on a protocol reported by Johnson and Kenny (2010). Daily food intake of mice (n=7 per group) was measured for 3 consecutive days. They were then food restricted and maintained at 85-90% of their free-feeding body weight. Mice were placed in operant chambers (Med Associates, Inc. - used only for computer controlled cue lights and shock delivery) and were given free access to 20mg sucrose pellets in the food. receptacle (Bio-Serv, NJ, USA) for 30 minutes for 5 to 7 days until sucrose intake varied by  $\leq 10\%$  for 3 consecutive days. This was followed by daily Pavlovian conditioning trials (30 min) for 4 days whereby mice had the same free access to sucrose pellets. During the first 10 minutes of each trial a cue light was turned on and paired with the delivery of a footshock (0.5 mA, 1 second duration) every minute emitted through the floor grid via a shock generator (Med Associates, Inc). During the next 10 minutes the cue light was off and no foot shocks were delivered. The last 10 minutes used the same parameters as the first 10 minutes. On the fifth day (test day), mice received a priming set of shocks (1 each minute for 5 minutes) with lights turned on but no food in the chamber. After this priming step, food was placed in the chamber, and the parameters were the same as for the pre-test protocol, except that there was no shock delivery; only the presence of the cue-light associative stimulus. Sucrose

consumed between baseline days (mean of last 3 days) and the test days were compared. Data are plotted as the mean $\pm$ SEM decrease in food intake between baseline and test day.

## **Western immunoblotting**

NAc microdissections were processed for western immunoblotting according to published procedures (Sharma et al., 2013).

## **D1 receptor-induced locomotor stimulation**

Basal locomotor activity was recorded for 1 hour in mice (n=6-8 per group) that were previously habituated to Comprehensive Lab Animal Monitoring System of the CRCHUM Rodent Metabolic Phenotyping Core (CLAMS; Columbus Instruments). Drug-naïve mice received 0.1 mg/kg IP dose of the D1R agonist SKF82958 (Santa Cruz Biotechnology, CA) and were placed back in metabolic chambers for locomotor measurements. SKF82958 was dissolved in 0.9 % saline.

## **Amphetamine locomotor sensitization**

This experiment was performed as described previously (Fulton et al., 2006) in drug-naïve mice. Following a 2-day habituation period to CLAMS cages, each mouse received three IP injections, each separated by 2 days, in the following order: (1) 1 mg/kg amphetamine (sub-threshold dose), (2) 4 mg/kg amphetamine (high dose), (3) 1 mg/kg amphetamine (repeat low dose). Locomotor activity was recorded for 2 hours

following injections. D-amphetamine (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) was dissolved in 0.9 % saline.

## **Quantitative real-time PCR**

Running -naïve mice were sacrificed and brain punches of the VTA and NAc were obtained from 300µm frozen coronal sections and processed for real-time quantitative PCR according to published procedures (Taib et al., 2013) using the following primers: Cyclophilin : 5'GCTTTTCGCCGCTTGCTGCA-3', 3'-TGCAAACAGCTCGAAGGAGACGC-5'. MOR: 5'- ACAGGCAGGGGTCCATAGAT-3', 3'-GTGATGATGAGGACCGGCAT-5', KOR: 5'- TGATCCTGCGCCTGAAGAGT-3', 3'-ATGCGGCGGAGATTTTCG-5', DOR: 5'- AAGGCTGTGCTCTCCATTGAC-3', 3'-TGTAGCGGTCCACGCTCAT-5', PPDyn: 5'- GCGTGGTCCAGGCTGATG-3', 3'-AGGCAGTCCGCCATAACATT-5', PPEnk: 5'- AGAAGCGAACGGAGGAGAGAT-3', 3'-TTCAGCAGATCGGAGGAGTTG-5', β-Endo: 5'- GCCTTTCCCCTAGAGTTCAA-3', 3'-GAGGTCATGAAGCCACCGTAA-5', CB1R: 5'- GTGCTGTTGCTGTTTCATTGTG-3', 3'-CTTGCCATCTTCTGAGGTGTG-5', ABHD6: 5'- ACTTGGTCTGTGTGGACATGC-3', 3'-GTGCCTATAAGGTGAAAGGGC-5', MGLL: 5'- GTGCCTACCTGCTCATGGAAT-3', 3'-GAGGACGGAGTTGGTCACTTC-5', FAAH: 5'- GTATCGCCAGTCCGTCATTG-3', 3'-GCCTATACCCTTTTTCATGCCC-5', For verification of Cre-dependent viral-mediated gene transfer in mice injected with AAV-DIO-STAT3, VTA were dissected from STAT3DAT KO mice and controls from the wheel running experiment and processed for real-time quantitative PCR as above for

STAT3: 5'- CATTGACCTGCCGATGTCCC -3', 3'- TCAAACGTGAGCGACTCAAAC-  
5'. All results were normalized to cyclophilin.

## **Supplemental References**

Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.P., Stiles, L., Frank, L., Pothos, E.N., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2006). Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron* 51, 811- 822.

Johnson, P.M. & Kenny, P.J. (2010). Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*, 13, 635-41. 10

Paxinos, G., and Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Gulf Professional Publishing).

Sharma, S., Fulton, S. (2013) Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International Journal of Obesity*, 37(3) : 383-9.

Taib, Bouyakdan, Hryhorczuk, Rodaros, Fulton and Alquier (2013) Glucose Regulates Hypothalamic via Long-chain Fatty Acid Metabolism AMP-activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes, *J Biol Chem* 288, 37216-37229

Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., and Akira, S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161, 4652- 4660.